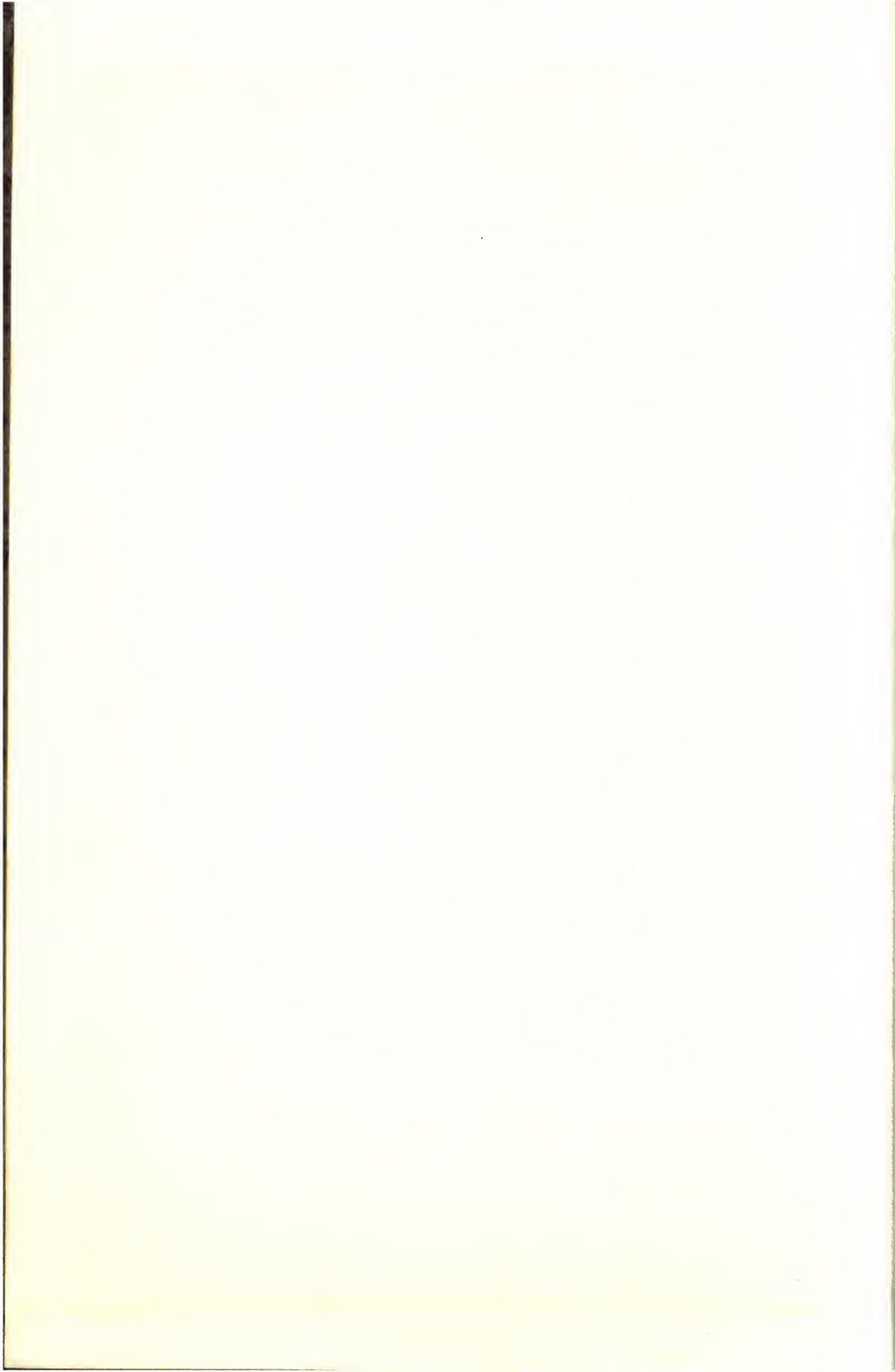


Р. Стейниер
Э. Эдельберг
Дж. Ингрэм

МИР МИКРОБОВ

2
ТОМ

Издательство
«Мир»
Москва



1

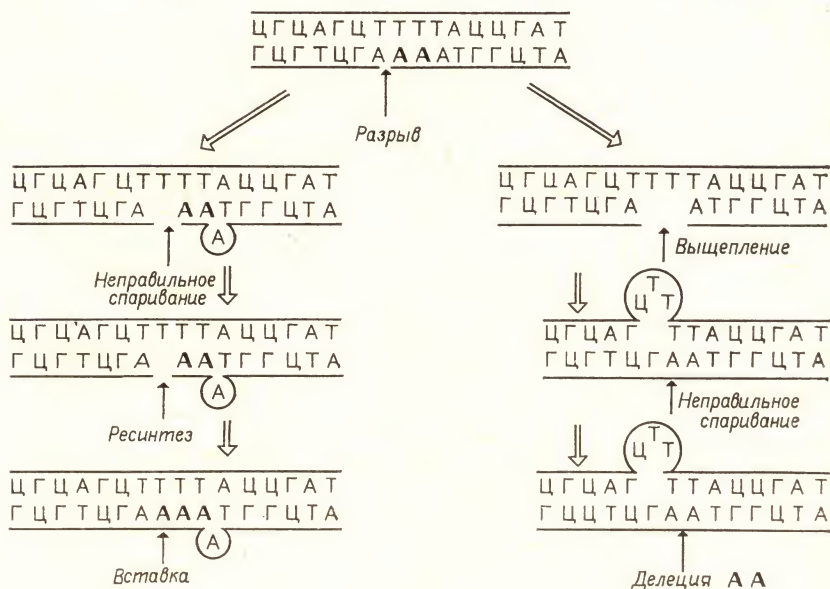
100

100

СПИСОК ОПЕЧАТОК

Страница	Строка	Напечатано	Следует читать
26	Табл 8.4 1 св.	d, e, f, q, h	d, e, f, g, h

На место рис. 13.9 (стр. 217) следует вклеить прилагаемый:





THE MICROBIAL WORLD

Fourth edition

ROGER Y. STANIER
Institut Pasteur
Paris 15^e, France

EDWARD A. ADELBERG
Yale University School
of Medicine
New Haven, Connecticut,
06510

JOHN L. INGRAHAM
University of California
Davis, California, 95616

Prentice-Hall, Inc.,
Englewood Cliffs,
New Jersey

Р. Стейниер
Э. Эдельберг
Дж. Ингрэм

МИР МИКРОБОВ

2
ТОМ

Перевод с английского
под редакцией
д-ра биол. наук Е. Н. КОНДРАТЬЕВОЙ
и
д-ра биол. наук С. В. ШЕСТАКОВА

Издательство
"Мир"
Москва
1979

Книга известных микробиологов, выдержала четыре издания и переведена на французский, испанский, итальянский и японский языки. Авторам удалось дать четкую картину мира микробов во всем его многообразии и взаимоотношениях с другими живыми существами; при этом широко используются последние достижения микробиологии, генетики и вирусологии.

На русском языке выходит в трех томах. Во втором томе приведены данные по регуляции обмена веществ, влиянию различных факторов на рост микроорганизмов, взаимосвязи структуры и функции, рассмотрены основные группы вирусов, мутации и процессы генетической рекомбинации.

Предназначена для микробиологов, вирусологов, биохимиков, генетиков, молекулярных биологов, врачей, для преподавателей, аспирантов и студентов университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных институтов.

Редакция литературы по биологии

Original English language edition published by Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, U.S.A.

© 1976, 1970, 1963, 1957, by Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey

2605030000

И 21007—431
С 041(01)—79 подписн.—79

© Перевод на русский язык, «Мир», 1979

Общая метаболическая активность растущего микроорганизма отражает одновременное действие многочисленных взаимосвязанных метаболических путей, как производящих энергию, так и биосинтетических. Каждый данный метаболический путь состоит из ряда отдельных реакций, катализируемых особыми ферментами. Продукт этого множества реакций — новая клетка. Для успешной конкуренции в природе необходимо, чтобы процесс роста был быстрым и эффективным. Поэтому клетка должна обладать способностью управлять скоростями отдельных реакций каждого метаболического пути и общими скоростями различных путей. Клетка может также вносить качественные преобразования в работу метаболического аппарата в ответ на изменение потребностей, вызванное в свою очередь изменениями в окружающей среде. Для осуществления этих функций у микроорганизмов возникли многочисленные *регуляторные механизмы*.

О существовании высокоразвитой системы регуляции микробного метаболизма свидетельствуют многие наблюдения. Одно из них состоит в том, что макромолекулярный состав бактерий зависит от питательных веществ, доступных для клеток. Первое систематическое исследование этого аспекта регуляции было проведено почти 20 лет назад О. Маалё (О. Maaløe) и его сотрудниками на энтеробактериях, в основном *Salmonella typhimurium*. Энтеробактерии могут синтезировать все клеточные компоненты из одного источника углерода и неорганических солей, а в качестве источников углерода они могут использовать множество органических соединений. Некоторые из них, такие, как ацетат, метаболизируются медленно и поддерживают низкую скорость роста; другие, например глюкоза, метаболизируются быстрее и обеспечивают более быстрый рост. Если в среду добавлены предшественники макромолекул (например, аминокислоты), то рост идет еще быстрее. Таким образом, изменяя состав среды при постоянной температуре, можно добиться, чтобы время удвоения биомассы культуры *S. typhimurium* варьировало от 20 мин до нескольких часов (при 37 °C). Более того, размер и состав клеток систематически изменяются в зависимости от скорости роста (табл. 8.1). Клетки, растущие с высокими скоростями, более богаты РНК, содержат меньше ДНК и имеют более крупные размеры, чем клетки, растущие с низкой скоростью. Эти изменения в составе клеток определяются только скоростью роста при условии, что температура остается постоянной.

ТАБЛИЦА 8.1

РАЗМЕР И СОСТАВ КЛЕТОК *SALMONELLA TYPHIMURIUM*, РАСТУЩИХ
ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНО С РАЗЛИЧНОЙ СКОРОСТЬЮ

Время удвоения биомассы, мин	Средний вес клетки, мкг	Содержание, % ¹			Число 70S-рибосом на клетку
		ДНК	общая РНК	рРНК ²	
25	0,77	3,0	31	25	69 800
50	0,32	3,5	22	14	16 300
100	0,21	3,7	18	9	7 100
300	0,16	4,0	12	4	2 000

¹ В расчете на вес сухого вещества клетки.² РНК, содержащаяся в рибосомах.

Влияние скорости роста на макромолекулярный состав клеток можно объяснить следующим образом: быстро растущая клетка должна синтезировать белок гораздо быстрее, чем медленно растущая клетка. Для осуществления же синтеза белка с высокой скоростью необходимо, чтобы клетка содержала большее число рибосом, так как скорость синтеза белка одной рибосомой постоянна. Способность бактерий регулировать число рибосом весьма важна для поддержания высокой скорости роста в различных условиях. Очевидно, что недостаточное число рибосом будет ограничивать скорость роста; так же будет влиять на рост и избыток рибосом, поскольку клетке придется заниматься непродуктивным синтезом рибосомных белков и РНК.

Сходным образом регулируются биосинтез и деградация малых молекул в бактериях, о чем свидетельствуют следующие данные, полученные на энтеробактериях.

1. При росте на синтетических средах, содержащих только одно органическое соединение в качестве источника энергии, бактерии синтезируют все мономерные предшественники макромолекул (например, аминокислоты) со скоростями, которые точно соответствуют скоростям синтеза макромолекул.

2. Как только какой-либо из этих мономерных предшественников добавляют в среду, его эндогенный синтез немедленно останавливается при условии, что экзогенно добавленный предшественник может проникнуть в клетку.

3. Образование ферментов, осуществляющих биосинтез этих мономеров, также прекращается.

4. Бактерии часто синтезируют ферменты, ответственные за усвоение тех или иных органических субстратов, только в том случае, если эти соединения присутствуют в среде.

5. Если имеется два органических субстрата, то бактерия сначала синтезирует ферменты, необходимые для усвоения соединения, которое поддерживает более быстрый рост;

только после того, как это соединение исчерпывается, синтезируются ферменты, необходимые для усвоения второго соединения.

БИОХИМИЧЕСКАЯ ОСНОВА РЕГУЛЯЦИИ

В клетке имеются два различных регуляторных механизма: регуляция *синтеза ферментов* и регуляция *активности ферментов*. Оба они действуют при посредстве низкомолекулярных соединений, которые либо образуются в клетке как промежуточные метаболиты, либо проникают в клетку из окружающей среды. В обоих регуляторных механизмах участвует особый класс белков, которые называются *аллостерическими белками*¹. Принципиальная важность аллостерических белков как ключевых компонентов регуляторных систем была впервые отмечена Ж. Моно (J. Monod) в 1963 г.

Аллостерические белки — это белки, свойства которых меняются при связывании некоторых специфических малых молекул — *эфффекторов*. Следовательно, *аллостерические белки — медиаторы метаболических изменений, управляемых изменениями концентрации молекул эфффекторов*.

Существует два класса аллостерических белков: *аллостерические ферменты*, активность которых повышается или понижается при связывании с эфффекторами, и *регуляторные аллостерические белки*, лишенные каталитической активности и регулирующие синтез определенных ферментов.

Регуляторные аллостерические белки присоединяются к бактериальной хромосоме вблизи структурных генов, активность которых находится под контролем этих белков. Связывание регуляторных белков с малыми молекулами эфффекторов приводит к изменению скорости синтеза специфических информационных РНК, кодируемых этими генами.

РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

К наиболее изученным в настоящее время аллостерическим белкам относятся аллостерические ферменты, примером которых может служить аспартат — карбамоилтрансфераза (аспартаттранскарабомилаза, или АТКаза). АТКаза катализирует первую реакцию биосинтеза пиримидинов (рис. 8.1). Ее активность ингибируется одним из конечных продуктов этого биосинтетического пути — цитидинтрифосфатом (ЦТФ). Следовательно, повышенная концентрация ЦТФ внутри клетки ингибирует действие АТКазы, а значит, и дальнейшее образование ЦТФ до тех пор, пока его концентрация не снизит-

¹ Слово *аллостерический* означает *другой формы*; оно подразумевает, что эфффекторы, регулирующие активность какого-либо аллостерического фермента, отличаются по структуре от его субстрата.

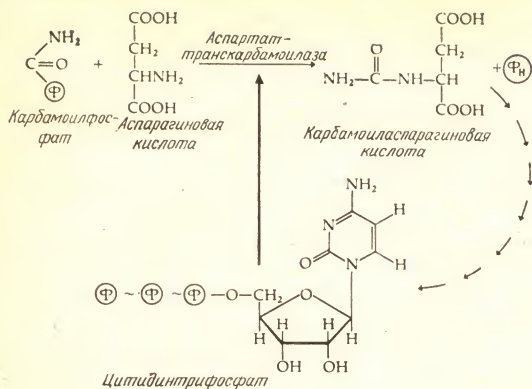


Рис. 8.1. Аллостерическая регуляция первой реакции биосинтеза пиримидинов (конденсация карбамоилфосфата и аспарагиновой кислоты с образованием карбамоиласпарагиновой кислоты). Фермент, осуществляющий эту реакцию, — аспартаттранскарбамоилаза — аллостерически ингибируется (сплошная линия) цитидинтрифосфатом, конечным продуктом данной последовательности биосинтетических реакций.

ся до оптимального уровня. Второй эффектор АТКазы, АТФ, *активирует* фермент и координирует таким образом синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

График зависимости скорости реакции, катализируемой АТКазой, от концентрации субстрата представляет собой S-образную кривую (рис. 8.2), а не гиперболу, типичную для неаллостерических ферментов (рис. 8.3). Специфическое действие аллостерического ингибитора, которое также показано на рис. 8.2, заключается в том, что S-образная форма кривой становится более выраженной и поэтому скорость реакции при низких концентрациях субстрата падает; такое ингибирование почти совсем прекращается при повышении концентрации субстрата. Кроме того, S-образный характер кривой зависимости активности фермента от концентрации субстрата показывает, что фермент имеет более одного участка связывания молекул субстрата (*каталитические центры*). Присоединение молекулы субстрата к одному из этих центров увеличивает способность фермента связывать дополнительные молекулы субстрата в других каталитических центрах, т. е. происходит *кооперативное взаимодействие* молекул субстрата с ферментом. Таким образом, по мере увеличения концентрации субстрата *скорость возрастания* активности фермента увеличивается. Такое же явление наблюдается и при связывании молекул эффектора: они также кооперативно взаимодействуют с *регуляторными центрами* фермента.

Судя по сложности кривых, приведенных на рис. 8.2, можно предположить, что аллостерические ферменты всегда являются белками с довольно высоким молекулярным весом и состоят из нескольких субъединиц. Как правило, эти субъединицы идентичны, причем каждая из них содержит каталитический и регуляторный центры. Однако АТКаза состоит из субъединиц двух типов: одни субъединицы выполняют каталитическую функцию, другие — регуляторную. Это позволяет особенно наглядно продемонстрировать, что аллостерический

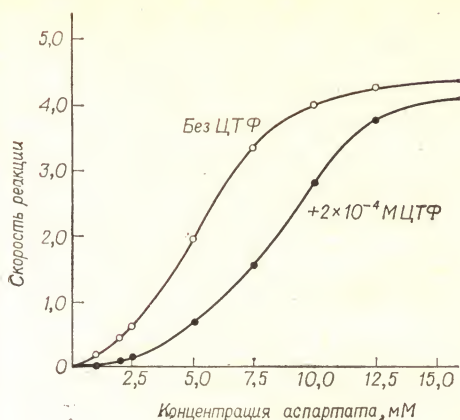


Рис. 8.2. Изменение скорости реакции, катализируемой аспартаттранскарбамоилазой, в зависимости от концентрации одного из субстратов — аспарагиновой кислоты. Отметьте S-образный характер кривой. Показано также влияние аллостерического ингибитора ЦТФ на активность аспартаттранскарбамоилазы. [Gerhart J. C., Pardee A. B., The enzymology of control by feed-back inhibition, J. Biol. Chem., 237, 891 (1962).]

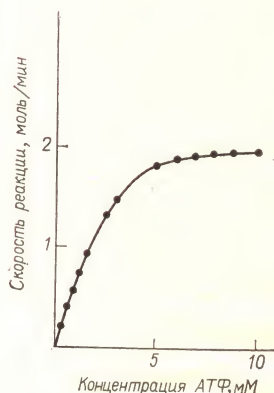


Рис. 8.3. Изменение скорости реакции, катализируемой типичным неаллостерическим ферментом (нуклеозиддифосфаткиназой), в зависимости от концентрации одного из субстратов — АТФ. От-

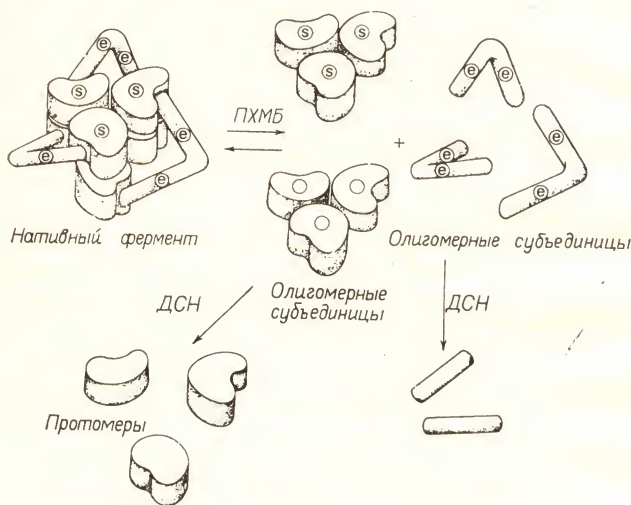
метьте гиперболическую форму кривой. [Ginther C. L., Ingraham J. L., Nucleoside diphosphokinase of *Salmonella typhimurium*, J. Biol. Chem., 249, 3406 (1974).]

и каталитический центры пространственно разобщены. При мягком химическом воздействии (например, *n*-хлормеркурибензоатом) АТКЗа диссоциирует на субъединицы. Одна из них (каталитическая) обладает полной ферментативной активностью интактного фермента, но нечувствительна к аллостерическому ингибированию цитидинтрифосфатом или к аллостерической активации аденозинтрифосфатом. Другая субъединица (регуляторная) не проявляет каталитической активности, но обладает способностью связывать ЦТФ или АТФ (рис. 8.4). Таким образом, связывание ЦТФ с одной субъединицей ингибирует специфическую, катализируемую ферментом реакцию, протекающую на другой субъединице. Детальный механизм такого аллостерического ингибирования пока неизвестен, но в нем, очевидно, участвует какое-то конформационное изменение фермента. Когда концентрация в клетке конечного продукта (эффектора) данного биосинтетического пути повышается, каталитическая активность аллостерического фермента, с которым он соединяется, пони-

Рис. 8.4. Диссоциация нативной аспартаттранскарбамоилазы на две каталитические и три регуляторные субъединицы (олигомеры) при мягкой химической обработке, например *n*-хлормеркурибензоатом (ПХМБ). При более жестком химическом воздействии, например в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), выявляется, что каждая каталитическая субъединица состоит из трех, а каждая регуля-

торная субъединица — из двух полипептидных цепей (протомеров). Каждый каталитический протомер содержит один каталитический центр (s), с которым связываются субстраты, а каждый регуляторный протомер — один регуляторный центр (e), с которым связываются эффекторы. Каталитические субъединицы каталитически активны, но нечувствительны к аллостерическому ингибированию

или активации. Регуляторные субъединицы каталитически неактивны, но сохраняют способность связывать аллостерические эффекторы. Настоящая модель фермента предложена в статье Cohlberg J. A., Pigie V. R., Schachman H. K., Structure and arrangement of the regulatory subunits in aspartate transcarbamylase, Biochemistry, 11, 3393 (1972).



жается. Поскольку активность этого фермента в свою очередь контролирует скорость биосинтеза конечного продукта (эффектора), образование последнего также замедляется и его концентрация внутри клетки начинает падать. Вследствие этого снижается и уровень аллостерического ингибирования. С помощью такого механизма *регуляции по принципу обратной связи* или *ингибирования конечным продуктом* в клетке поддерживается нужная концентрация биосинтетических интермедиатов. Обычно мишенью ингибирования конечным продуктом (или продуктами) того или иного биосинтетического пути является фермент, осуществляющий первую реакцию данного пути. Очевидно, что в этом случае ни конечный продукт, ни интермедиаты, участвующие в его образовании, не могут накапливаться в клетке. При посредстве такой регуляции скорость образования метаболитических интермедиатов влияет на скорость функционирования катаболических путей.

Благодаря этому контролируется первичная скорость поступления углерода во все биосинтетические последовательности реакций и общая скорость синтеза АТФ.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ

Ингибирование конечным продуктом, осуществляемое аллостерическими ферментами, в основном достаточно для того, чтобы все биосинтетические и катаболические реакции протекали в равновесии друг с другом. Однако, если продукт какой-либо последовательности реакций не нужен, ферменты, катализирующие эти реакции, становятся избыточными. В регуляции микробного метаболизма участвуют также механизмы, изменяющие ферментативный состав клетки; эта регуляция осуществляется на уровне выражения генов, и ее генетические аспекты обсуждаются в гл. 13.

ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ

Многие бактерии способны использовать в качестве источника углерода и энергии самые разнообразные органические соединения, но в каждый данный момент в среде может присутствовать лишь одно из этих соединений. Хотя генетическая информация, необходимая для синтеза соответствующих ферментов, имеется в клетке всегда, ее фенотипическое выражение определяется условиями окружающей среды и данный фермент синтезируется только тогда, когда имеется его субстрат.

Индукция синтеза фермента происходит под действием некаталитических аллостерических белков, которые являются продуктами определенных регуляторных генов; они контролируют синтез ферментов негативно, т. е. связываются с бактериальной хромосомой в каком-то участке вблизи структурных генов, детерминирующих синтез этих ферментов, и препятствуют их транскрипции. Такие белки носят название *репрессоры*. Если репрессор связывается со своим специфическим аллостерическим эффектором, который называется *индуктором*, он утрачивает способность блокировать транскрипцию, в результате чего начинается синтез определенного фермента.

Этот тип регуляции синтеза ферментов был впервые обнаружен Ж. Моно и его коллегами при изучении индукции ферментов, обеспечивающих усвоение лактозы клетками *E. coli*.

Хотя клетки *E. coli* образуют ферменты, необходимые для метаболизма глюкозы, независимо от условий выращивания (такие ферменты называются *конститутивными*), в клетках, растущих на глюкозе, с трудом можно обнаружить лишь незначительные количества ферментов, катализирующих начальные реакции метаболизма лактозы. Однако в клетках, растущих на лактозе, эти ферменты присутствуют в больших количествах. Поскольку их образование индуцируется лакто-

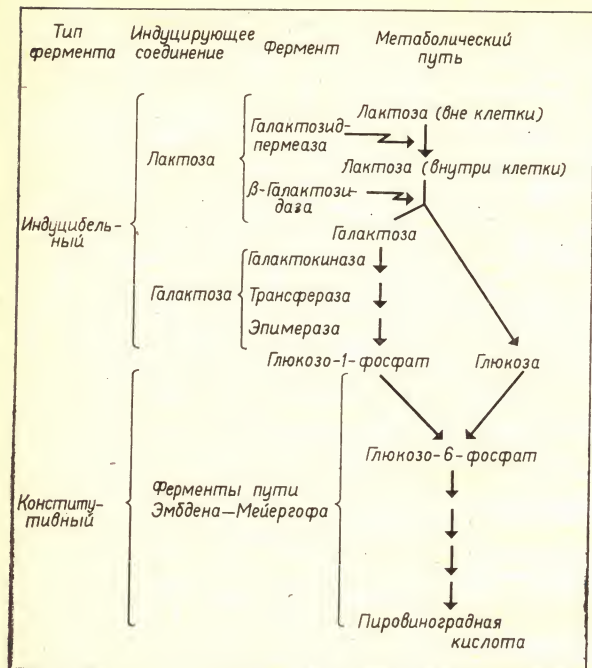


Рис. 8.5. Изменение набора ферментов клетки *E. coli* под действием лактозы. Два индуцибельных фермента синтезируются согласованно непосредственно под действием лактозы. Один из продуктов катализируемой ими последовательности реакций, глюкоза, расщепляется далее конститутивными ферментами пути Эмбдена—Мейергофа. Другой продукт, галактоза, индуцирует согласованный синтез еще трех ферментов, катализирующих ее превращение в глюкозо-1-фосфат (интермедиат пути Эмбдена—Мейергофа).

зой, они получили название *индуцибельные ферменты*; к ним относятся *галактозидпермеаза* — белок, обеспечивающий проникновение лактозы в клетку, и *β-галактозидаза* — фермент, катализирующий гидролитическое расщепление лактозы на составляющие моносахариды — глюкозу и галактозу. Галактоза, образовавшаяся под действием β-галактозидазы, в свою очередь индуцирует ряд ферментов, участвующих в метаболизме галактозы. Таким образом, воздействие лактозы на клетку приводит к непосредственной индукции ферментов, осуществляющих расщепление лактозы на составляющие моносахариды, и косвенной (вторичной) индукции ферментов метаболизма галактозы. Такая сложная индукция называется *последовательной индукцией*, так как метаболизм первого индуцирующего субстрата (в данном случае лактозы) приводит к образованию в клетке метаболита (в данном случае галактозы), который по своей индуцирующей способности отличается от первичного субстрата (рис. 8.5).

Если сам индуцирующий субстрат — единственный доступный для культуры источник углерода и энергии, то кинетика синтеза фермента приобретает сложный характер, поскольку фермент необходим как для расщепления субстрата, так и для образования АТФ и метаболитических интермедиатов, которые в свою очередь нужны для синтеза самого фермента. Таким образом, скорость синтеза фермента часто пропорцио-

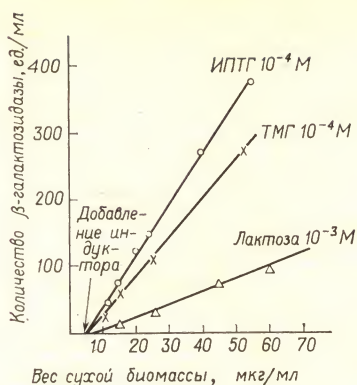


Рис. 8.6. Влияние на относительную скорость синтеза β -галактозидазы в клетках *E. coli*, растущих на минеральной среде с глицерином в качестве источника углерода, трех различных индукторов: естественного индуктора — лактозы и двух аналогов лактозы — изопропилтиогалактозида (ИПТГ) и тиометилгалактозида (ТМГ). Хотя эти аналоги не встречаются в природе и не гидролизуются β -галактозидазой, они значительно более эффективны в качестве индукторов, чем лактоза.

нальна количеству уже синтезированного фермента. Менее сложная ситуация наблюдается в условиях, когда на синтез фермента не влияют метаболические процессы, которые обычно являются результатом активности индуцируемых ферментов. Этого можно достичь, если использовать аналог индуцирующего субстрата, который может вызывать индукцию, но не подвергается превращению под действием индуцируемого фермента; культура выращивается в присутствии метаболически независимого источника углерода и энергии (например, глицерина).

Такая индукция синтеза β -галактозидазы неметаболизирующимися аналогами субстрата проявляет весьма характерную зависимость от времени. После добавления индуктора следует непродолжительная задержка, а затем начинается синтез фермента. Он продолжается (до тех пор, пока в среде имеется индуктор) с постоянной *относительной скоростью*, т. е. β -галактозидаза составляет постоянную долю всего ново-синтезированного белка клетки. Постоянство относительной скорости синтеза фермента после индукции можно продемонстрировать, если отложить на графике зависимость активности фермента от клеточной массы (рис. 8.6). Получается прямая линия, которая показывает, что определенное увеличение общей массы клеток все время сопровождается пропорциональным увеличением количества β -галактозидазы. Каждому индуктору соответствует своя относительная скорость синтеза фермента; измерение относительных скоростей позволяет количественно сравнивать эффективность различных индукторов. Эффективность лактозы как индуктора также можно оценить, хотя она и расщепляется β -галактозидазой (рис. 8.6). Довольно любопытно, что лактоза, природный индуктор β -галактозидазы, менее эффективна, чем многие синтетиче-

ские аналоги, которые не встречаются в природе. Действительно, тщательное изучение роли лактозы как индуктора показало, что для инициации синтеза фермента необходимо, чтобы небольшое количество лактозы было вначале превращено (под действием каталитической активности ничтожного количества β -галактозидазы, присутствующей в неиндуцированной клетке) в другой галактозид, который и служит фактически индуцирующим соединением. Следовательно, лактоза не является непосредственным индуктором синтеза ферментов в отличие от более активных синтетических аналогов (например, изопропил- β -тио-D-галактозида). Эта ситуация, видимо, представляет собой исключение из общего правила, так как обычно субстраты или основные метаболические продукты индуцибельных ферментов действуют как их непосредственные индукторы.

Все соединения, способные индуцировать β -галактозидазу, индуцируют также синтез галактозидпермеазы, и соотношение относительных скоростей синтеза этих двух ферментов всегда постоянно. Если синтез двух или большего числа ферментов проявляет такую тесную физиологическую взаимосвязь, его называют *координированным*. Координация обычно, но не всегда — следствие близости структурных генов соответствующих ферментов на бактериальной хромосоме; другими словами, она является фенотипическим проявлением общей системы генетической регуляции (см. гл. 13).

Если при воздействии на клетки первичного индуктора (например, лактозы, рис. 8.5) происходит последовательная индукция ряда генов, то вторичная индукция (скажем, индукция ферментов метаболизма галактозы) никогда не координируется с первичной (т. е. с индукцией β -галактозидазы и галактозидпермеазы), так как никакого общего генетического регуляторного механизма, связывающего эти два процесса, не существует. Это можно продемонстрировать на физиологическом уровне: непосредственное воздействие на клетку метаболитного индуктора, который обычно образуется из первичного субстрата, не вызывает синтеза ферментов, участвующих в усвоении первичного субстрата. Поэтому клетки *E. coli*, растущие на галактозе, содержат очень мало β -галактозидазы.

ПОЗИТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ

Хотя большинство изученных до сих пор систем индукции синтеза ферментов, подобно лактозной системе, действует только путем негативной регуляции, индукция синтеза ферментов метаболизма арабинозы у *E. coli* находится под контролем репрессора, который может осуществлять как позитивную, так и негативную регуляцию. Арабинозный репрессор всегда связан с хромосомой, а его влияние на процесс транс-

крипции изменяется при связывании индуктора (арабинозы). Когда арабиноза отсутствует, репрессор блокирует транскрипцию точно так же, как это делает лактозный репрессор. Однако, связавшись с арабинозой, репрессор претерпевает конформационное изменение, в результате чего он превращается в активатор, включающий транскрипцию. С физиологической точки зрения позитивная и негативная регуляция неразличимы. Их можно различить только путем тщательного изучения мутаций, влияющих на действие регуляторного гена.

КАТАБОЛИТНАЯ РЕПРЕССИЯ

Около 35 лет назад Ж. Моно открыл явление, которое называется *диауксией*. Он заметил, что рост культуры *E. coli* в среде, содержащей в качестве источника углерода какую-либо пару соединений (например, глюкозу и галактозу), проходит через две стадии, представляющие собой две экспоненциальные фазы роста, разделенные отчетливой лаг-фазой (рис. 8.7). В течение первой стадии используется глюкоза, в течение второй — галактоза. До исчерпания в среде запасов глюкозы ферменты метаболизма лактозы не синтезируются (хотя индуктор все время присутствует). Метаболизм глюкозы препятствует индукции синтеза β -галактозидазы и галактозидпермеазы. Подобные кривые роста получаются на средах, содержащих глюкозу в сочетании с рядом других источников углерода, которые расщепляются индуцибельными ферментами. Вначале считалось, что этот тип подавления индукции синтеза ферментов возможен только в случае использования глюкозы, поэтому его называли «глюкозным эффектом». Дальнейшие исследования показали, что все быстро расщепляющиеся источники энергии подавляют образование ферментов, необходимых для усвоения более медленно расщепляющихся источников энергии, и теперь это явление называют *катаболитной репрессией*.

В результате катаболитной репрессии клетка всегда в первую очередь использует субстрат, поддерживающий наиболее высокую скорость роста. Однако, помимо этого, система катаболитной репрессии регулирует скорость расщепления источников углерода. Даже при росте на единственном источнике углерода количества ферментов, необходимых для образования АТФ, регулируются с помощью механизма катаболитной репрессии.

Уровень катаболитной репрессии пропорционален внутриклеточному содержанию АТФ. При этом синтез всех катаболических ферментов регулируется единственным аллостерическим белком, который обозначают БАК (*белок, активируемый катаболизмом*). Его эффектор — нуклеотид, циклический аденозин-3',5'-монофосфат (циклический АМФ) — синтезируется из АТФ. С помощью каких-то пока еще не совсем понятных механизмов внутриклеточная концентрация циклического

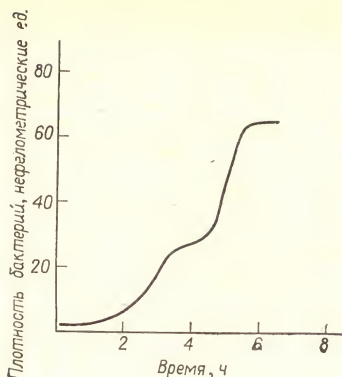


Рис. 8.7. Диауксический рост культуры *E. coli* на минеральной среде, содержащей равные количества глюкозы и лактозы, используемых в качестве источника углерода. Временное прекращение роста примерно через 4 ч соответствует полной утилизации глюкозы. Во время лаг-периода начинается синтез β -галактозидазы и галактозидпермеазы. (Monod J., La croissance des cultures bactériennes, Paris, Hermann, 1942.)

АМФ изменяется в обратной зависимости от количества АТФ. Поэтому, когда клетка растет на быстро расщепляющихся субстратах, внутриклеточная концентрация циклического АМФ низка; когда клетка растет на медленно расщепляющихся субстратах, его концентрация высока. Циклический АМФ был обнаружен во всех исследованных бактериях. Поскольку он не является интермедиатом какого-либо известного метаболического пути, единственной физиологической функцией, которую циклический АМФ выполняет в клетках бактерий, является, видимо, регуляторная функция¹. Присоединение циклического АМФ к БАК вызывает в белке аллостерическое изменение, позволяющее ему связываться с хромосомой вблизи генов, кодирующих ферменты, подчиняющиеся катаболитной репрессии; такое связывание стимулирует транскрипцию этих генов. В отсутствие циклического АМФ БАК неактивен. Итак, для синтеза ферментов, осуществляемого под контролем механизма катаболитной репрессии, необходимо наличие БАК и относительно высоких внутриклеточных концентраций циклического АМФ. Мутантные штаммы, у которых отсутствует способность к синтезу БАК или циклического АМФ, не могут вследствие этого синтезировать многие ферменты.

Следует отметить, что эффективность действия какого-либо источника энергии в качестве катаболитного репрессора зависит не от его химической структуры, а исключительно от его эффективности как источника углерода и энергии. Хемогетеротрофные бактерии сильно различаются по относительной эффективности использования различных органических соединений в качестве источников углерода и энергии. Поэтому соединения, являющиеся наиболее активными катаболит-

¹ У эукариот циклический АМФ также действует как регулятор, но здесь он участвует не только в регуляции синтеза ферментов, но и в клеточной дифференцировке.

ными репрессорами у одного организма, могут быть сравнительно малоактивны у другого. Например, для *E. coli* глюкоза — гораздо более эффективный катаболитный репрессор, чем сукцинат, тогда как для *Pseudomonas putida* наблюдается обратное соотношение эффективностей этих двух соединений.

РЕПРЕССИЯ КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ

Добавление в питательную среду соединения, являющегося конечным продуктом какого-либо биосинтетического пути (например, аминокислоты), вызывает у многих бактерий замедление или быструю остановку синтеза ферментов соответствующего пути. Это явление называется *репрессией конечным продуктом*.

Ферменты, синтез которых обычно подавляется конечным продуктом, могут быть *дерепрессированы* (т. е. могут синтезироваться быстрее, чем в норме), если внутриклеточная концентрация конечного продукта падает до очень низкого уровня. В частности, ферменты, осуществляющие биосинтез аргинина, часто могут быть дерепрессированы в бактериях, растущих в среде, содержащей многие другие аминокислоты. В таких условиях скорость синтеза белка ограничивается в первую очередь скоростью синтеза аргинина. В результате внутриклеточная концентрация аргинина падает, что приводит к включению механизма дерепрессии.

Таким образом, регуляция биосинтетических путей по принципу обратной связи осуществляется двумя способами: ингибированием конечным продуктом (регуляция активности ферментов) и репрессией конечным продуктом (регуляция синтеза ферментов). Хотя репрессия конечным продуктом оказывает немедленное воздействие на скорость синтеза фермента, тем не менее, если бы не существовало другого регуляторного механизма, биосинтетический путь все равно продолжал бы функционировать до тех пор, пока предсуществующие ферменты не были разбавлены до низкой концентрации вследствие продолжающегося роста клеток; в то же время ингибирование активности ферментов конечным продуктом мгновенно останавливает действие биосинтетического пути. Следовательно, механизмы репрессии и ингибирования конечным продуктом дополняют друг друга и при совместном действии весьма эффективно регулируют биосинтетические процессы. Все биосинтетические пути находятся под контролем механизма репрессии конечным продуктом; таким же способом регулируются обычно и все ферменты данного пути.

Была подробно изучена репрессия конечным продуктом синтеза ферментов, катализирующих последовательность реакций биосинтеза триптофана у *E. coli*. Особый ген (*trp R*) обеспечивает синтез аллостерического белка, называемого

триптофановым репрессором, единственной функцией которого является регуляция биосинтеза ферментов этой последовательности реакций. В свободном состоянии репрессор неактивен, но при связывании с триптофаном (корепрессором) он претерпевает аллостерическое изменение, позволяющее ему связаться с участком хромосомы вблизи структурных генов и препятствовать таким образом их транскрипции¹. Мутанты, не способные продуцировать репрессор, становятся нечувствительными к конечному продукту; они образуют большое количество ферментов биосинтеза триптофана при всех условиях (т. е. они конститутивны в отношении этих ферментов).

Ферменты биосинтеза аргинина у энтеробактерий регулируются с помощью механизма, аналогичного механизму регуляции ферментов синтеза триптофана; их синтез также контролируется особым белком-репрессором, который кодируется геном *arg R*. Однако ферменты биосинтеза гистидина регулируются по-другому. Хотя подробно этот механизм пока не изучен, ясно, что специального белкового репрессора ферментов синтеза гистидина не существует. Возможно, что один из ферментов этого биосинтетического пути сам действует в качестве репрессора.

Общие положения, изложенные в настоящей главе, основаны в значительной степени на данных, полученных при изучении энтеробактерий; они, вероятно, приложимы и к другим бактериям.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ: ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все известные регуляторные механизмы действуют при участии аллостерических белков, активность которых изменяется при связывании с ними небольших молекул. Поэтому они служат чувствительными детекторами внутриклеточной концентрации ключевых метаболитов и изменяют общую метаболическую активность клетки таким образом, чтобы обеспечить максимальную скорость роста за счет наиболее эффективного превращения питательных веществ в компоненты клетки. Все эти механизмы и их характерные особенности рассмотрены вкратце в табл. 8.2.

СЛОЖНЫЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ

Можно сделать некоторые обобщения относительно регуляции метаболических путей. В неразветвленных последовательностях биосинтетических реакций активность первого фермента ингибируется конечным продуктом, а биосинтез всех фермен-

¹ Регуляция синтеза ферментов, участвующих в биосинтезе триптофана или гистидина, осуществляется более сложным путем: помимо регуляции на уровне инициации транскрипции при участии репрессора имеется также регуляторный механизм, контролирующий терминацию транскрипции в начале оперона. — *Прим. ред.*

ТАБЛИЦА 8.2

ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИЙ

Механизм	Аллостерический белок		Эффектор	Активность аллостерического белка		Физиологическое действие
	Первый фермент метаболического пути (аспартат-транскарбамоилаза)	Второй фермент метаболического пути (ЦФ)		свободного	связанного с эффектором	
Ингибирование конечным продуктом (регуляция биосинтеза пиримидинов по принципу обратной связи) ¹	Первый фермент метаболического пути (аспартат-транскарбамоилаза)	Конечный продукт метаболического пути (ЦФ)	Конечный продукт метаболического пути (ЦФ)	Катализирует первую реакцию метаболического пути	Имеет пониженную каталитическую активность	Регулирует биосинтез небольших молекул (ЦФ)
Индукция синтеза ферментов; негативная регуляция (индукция β-галактозидазы)	Репрессор (продукт гена <i>lac I</i>)	Индуктор (лактоза) ²	Индуктор (лактоза) ²	Связывается с хромосомой; препятствует синтезу фермента	Не способен связываться с хромосомой; препятствует синтезу фермента	Ферменты синтезируются только в том случае, если их субстраты присутствуют в среде
Индукция синтеза ферментов; позитивная регуляция (индукция ферментов метаболизма арабинозы)	Репрессор-активатор (продукт гена <i>ara C</i>)	Индуктор (арабиноза)	Индуктор (арабиноза)	Репрессирующая форма; связывается с хромосомой и препятствует синтезу фермента	Активирующая форма; связывается с хромосомой и делает возможным синтез фермента	Ферменты синтезируются только в том случае, если их субстраты присутствуют в среде
Катаболическая репрессия (репрессия синтеза β-галактозидазы глюкозой)	БАК	Циклический АМФ	Циклический АМФ	Не может связываться с хромосомой	Связывается с хромосомой и стимулирует синтез фермента	Дает возможность клетке использовать большинство выгодных источников углерода; регулирует скорость катаболизма
Репрессия конечным продуктом (регуляция синтеза ферментов, необходимых для биосинтеза триптофана)	Репрессор (продукт гена <i>trp R</i>)	Конечный продукт биосинтетического пути (триптофан)	Конечный продукт биосинтетического пути (триптофан)	Не может связываться с хромосомой	Связывается с хромосомой и препятствует синтезу фермента	Регулирует синтез ферментов, участвующих в биосинтетическом пути (ферменты биосинтеза триптофана)

¹ Обратите внимание на примеры действия основных регуляторных механизмов, приведенные в скобках.² Лактоза не является истинным индуктором (см. в тексте).

тов репрессируется конечным продуктом. Поток вещества через катаболические пути, в которых участвуют источники углерода, присутствующие обычно в окружающей среде, регулируется в основном аллостерическими ферментами; ферменты таких последовательных цепей реакций синтезируются конститутивно и лишь в небольшой степени подвержены катаболитной репрессии. Пути катаболизма субстратов, которые реже встречаются в окружающей среде, регулируются в первую очередь механизмами индукции ферментов и катаболитной репрессии, а не аллостерическими ферментами.

ИНГИБИРОВАНИЕ КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ В РАЗВЕТВЛЕННЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЯХ

Многие биосинтетические пути дают два или большее число конечных продуктов. Ингибирование таких путей конечным продуктом носит более сложный характер, чем в случае простых неразветвленных путей. Например, если в разветвленной последовательности реакций, приводящих к синтезу двух различных аминокислот (рис. 8.8), фермент, катализирующий первую реакцию пути (фермент а), будет ингибироваться по механизму обратной связи одним из конечных продуктов (например, аминокислотой I), то совершенно очевидно, что одновременно будет подавляться и синтез другого конечного продукта (т. е. аминокислоты II). Следовательно, присутствие аминокислоты I в среде будет эффективно подавлять эндогенный синтез аминокислоты II и рост прекратится. В действительности ингибирование конечным продуктом в случае разветвленных биосинтетических путей часто специфически направлено только на фермент, который катализирует первую реакцию бокового пути, приводящего к синтезу данного конечного продукта. Так, аминокислота I воздействует по механизму обратной связи на фермент d, а аминокислота II — на фермент g. Тем не менее для эффективной регуляции разветвленного биосинтетического пути необходимо контролировать с помощью обратной связи также и активность начального фермента а, катализирующего первую реакцию общего участка пути. Известен ряд механизмов обратной связи, обеспечивающих такую регуляцию.

1. *Изофункциональные ферменты.* Клетка синтезирует два фермента (а и а'), которые обладают одной и той же каталитической активностью, но ингибируются различными конечными продуктами (рис. 8.9). Если в окружающей среде нет ни одного из конечных продуктов, ферменты а и а' активны и вместе образуют достаточное количество интермедиата А, чтобы удовлетворить потребности клетки в обоих конечных продуктах. Если в среде имеется один из конечных продуктов, синтез А снижается в результате специфического ингибирования а или а'. Если в среде присутствуют оба конечных

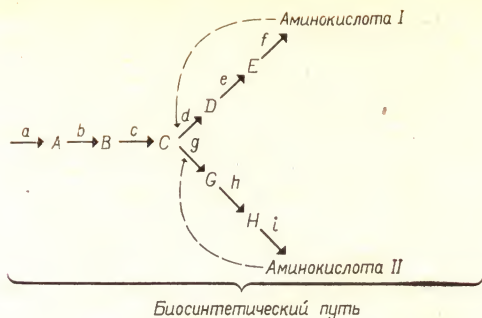


Рис. 8.8. Общая схема разветвленного биосинтетического пути, приводящего к образованию двух необходимых метаболитов (в данном случае аминокислот). Стрелками указаны катализируемые ферментами (строчные буквы) реакции, в результате которых образуются биосинтетические интермедиаты (прописные буквы). Прерывистые линии обозначают ингибирующее действие конечных продуктов на чувствительные аллостерические ферменты.

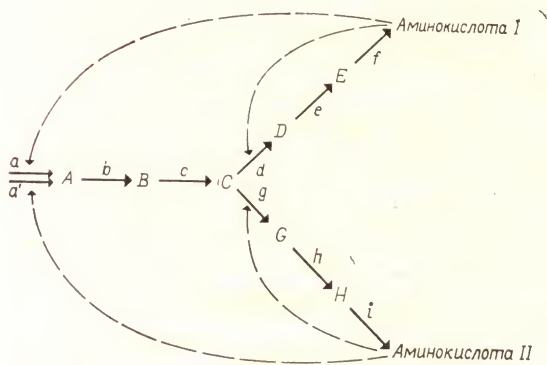


Рис. 8.9. Схема регуляции разветвленного биосинтетического пути с помощью ингибирования активности изофункциональных ферментов конечными продуктами (обозначения те же, что и на рис. 8.8).

продукта, последовательность реакций перестает функционировать, так как активности a и a' подавлены.

2. **Согласованное ингибирование.** Регулируемая реакция катализируется одним ферментом a с двумя различными аллостерическими участками, каждый из которых связывает один из конечных продуктов данной последовательности реакций (рис. 8.10). Если только один из этих участков занят эффектором, активность фермента не изменяется. Если же с ферментом связываются оба эффектора, он становится неактивным. Согласованное ингибирование по принципу обратной связи не обеспечивает достаточно точной регуляции, так как в присутствии только одного конечного продукта скорость реакции не изменяется. Однако ингибирование такого типа приводит к полному блокированию биосинтетического пути в том случае, если присутствуют оба конечных продукта.

3. **Последовательное ингибирование.** Регулируемая реакция катализируется одним ферментом a , но его эффектором

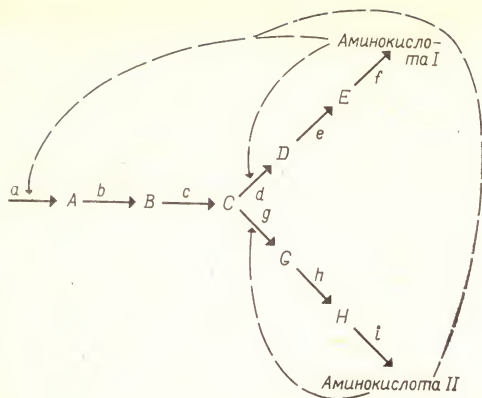


Рис. 8.10. Схема регуляции разветвленного биосинтетического пути с помощью механизма согласованного ингибирования активности ферментов несколькими конечными продуктами (обозначения те же, что и на рис. 8.8).

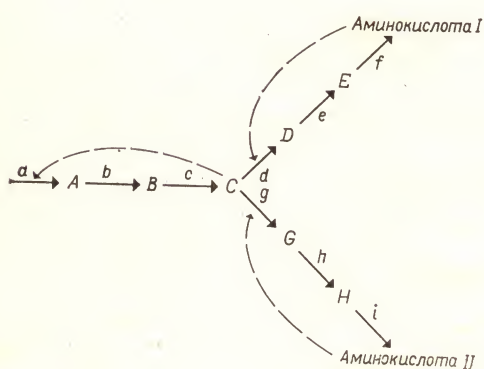


Рис. 8.11. Схема регуляции разветвленного биосинтетического пути с помощью механизма последовательного ингибирования активности ферментов (обозначения те же, что на рис. 8.8).

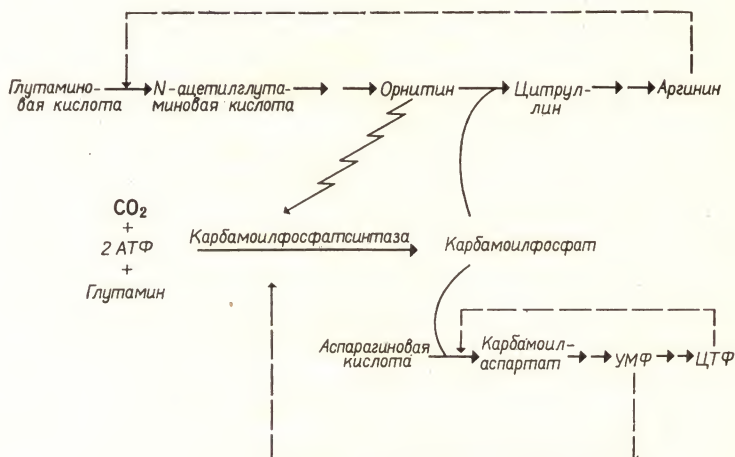
является не конечный продукт последовательности реакций, а интермедиат С, образующийся непосредственно перед разветвлением пути. При повышении концентрации конечного продукта (аминокислоты I или II) ферменты *d* и *g* ингибируются, в результате чего повышается внутриклеточная концентрация С, который в свою очередь ингибирует активность фермента *a* (рис. 8.11).

4. *Кумулятивное ингибирование.* В некоторых разветвленных метаболических путях, приводящих к образованию большого числа конечных продуктов, один аллостерический фермент содержит эффекторные участки для всех конечных продуктов. Каждый конечный продукт (даже в высокой концентрации) лишь частично ингибирует фермент, причем ингибирующее действие различных конечных продуктов является аддитивным. Таким образом, скорость реакции, катализируемой ферментом *c*, определяется числом (и концентрацией) различных конечных продуктов данного пути, присутствующих в среде. Такую регуляцию называют *кумулятивным ингибированием по принципу обратной связи*.

Рис. 8.12. Регуляция активности карбамоилфосфатсинтазы у энтеробактерий. Прерывистые линии обозначают воздействие ингибиторов на чувствительные аллосте-

рические ферменты. Волнистая линия (от орнитина к карбамоилфосфатсинтазе) обозначает активацию. Двойной контроль активности карбамоилфосфатсинтазы по-

средством ингибирования уридилевой кислотой (УМФ) и активации орнитином обеспечивает синтез нужного количества карбамоилфосфата при всех условиях роста.



5. *Сочетание активации и ингибирования.* В некоторых случаях биосинтетические интермедиаты, образующиеся в ходе определенной последовательности реакций, участвуют затем в двух совершенно независимых биосинтетических путях; в качестве примера можно привести карбамоилфосфат, который является общим интермедиатом синтеза аргинина и пиримидинов (рис. 8.12). У энтеробактерий фермент, ответственный за синтез этого интермедиата, — карбамоилфосфатсинтаза, аллостерически ингибируется метаболитом пиримидинового пути УМФ и аллостерически активируется интермедиатом аргининового пути орнитином. Если в среде присутствуют пиримидины, внутриклеточный запас УМФ возрастает и карбамоилфосфатсинтаза ингибируется. Возникающий недостаток карбамоилфосфата вызывает накопление орнитина, что в свою очередь приводит к активации фермента; количество карбамоилфосфата становится достаточным для синтеза другого конечного продукта — аргинина. Наоборот, если в среде имеется аргинин, биосинтез орнитина останавливается, так как аргинин ингибирует синтетазу N-ацетилглутаминовой кислоты. В результате внутриклеточная концентрация орнитина падает и активность карбамоилфосфатсинтазы снижается.

РЕПРЕССИЯ СИНТЕЗА
КОНЕЧНЫМ ПРОДУКТОМ
В СЛУЧАЕ РАЗВЕТВЛЕННЫХ
БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

Механизмы репрессии синтеза ферментов разветвленных биосинтетических путей, как и механизмы ингибирования активности ферментов по принципу обратной связи, сложны и разнообразны. Например, синтез карбамоилфосфатсинтазы у *E. coli* частично подавляется аргинином или цитидинтрифосфатом (ЦТФ), а его полное подавление происходит при совместном действии этих двух метаболитов. Таким образом, синтез этого ключевого аллостерического фермента регулируется независимо двумя конечными продуктами, ни один из которых не влияет на активность фермента.

В случае изофункциональных ферментов, подчиняющихся независимому аллостерическому контролю со стороны различных конечных продуктов, синтез каждого фермента часто регулируется конечным продуктом, ингибирующим его активность; ниже будет приведен пример такой регуляции.

ПРИМЕРЫ РЕГУЛЯЦИИ
СЛОЖНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

В клетках *E. coli* превращение аспарагиновой кислоты в аспартилфосфат осуществляется тремя изофункциональными ферментами, два из которых (на рис. 8.13 они обозначены а и с) наделены еще одной каталитической функцией, состоящей в превращении полуальдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин. Фермент а, выполняющий обе эти функции, ингибируется по механизму обратной связи треонином, который в то же время и репрессирует его синтез. Фермент с, также осуществляющий обе функции, ингибируется и репрессируется лизином. Третья аспартокиназа (фермент б) не ингибируется конечным продуктом, но ее синтез репрессируется метионином (табл. 8.3).

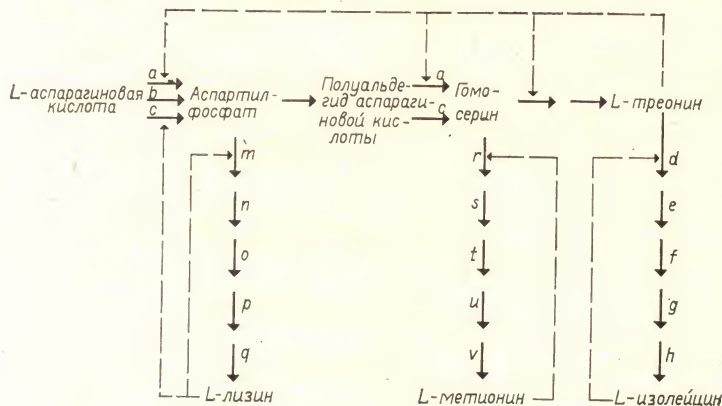
ТАБЛИЦА 8.3
РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРВОЙ РЕАКЦИИ ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ ТРЕМЯ РАЗЛИЧНЫМИ АСПАРТОКИНАЗАМИ, У БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI*

Фермент	Конечный продукт, репрессирующий синтез фермента	Конечный продукт, аллостерически ингибирующий активность фермента
Аспартокиназа I	Треонин и изолейцин	Треонин
Аспартокиназа II	Метионин	Аллостерической регуляции нет
Аспартокиназа III	Лизин	Лизин

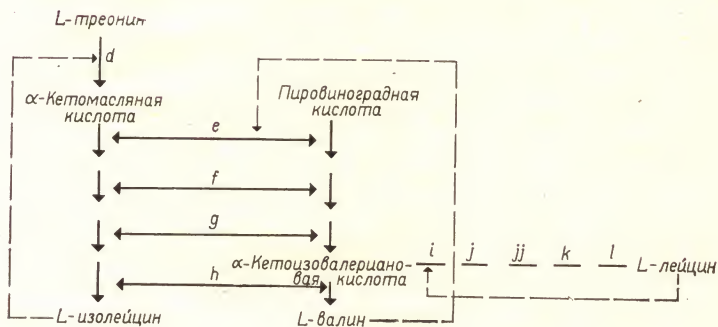
Рис. 8.13. Упрощенная схема пути превращения аспарагиновой кислоты у *E. coli*. Каждая сплошная стрелка обозначает реакцию, катализируемую одним ферментом. Продукты биосинтетического пути (обозначены жирным шрифтом) являются аллостерическими ингибиторами одной или нескольких ре-

акций. Аспартилфосфат синтезируется с помощью трех, а гомосерин — двух изофункциональных ферментов. При внимательном рассмотрении этой схемы видно, что, за одним исключением (ингибирующее действие валина, см. текст), ингибирующее действие одной аминокислоты не приводит к нехватке другой

аминокислоты. Репрессия синтеза конечным продуктом описана в тексте. В части А показана взаимосвязанная регуляция L-лизиновой, L-метиониновой и L-изолейциновой ветвей пути. Часть Б иллюстрирует взаимосвязь механизмов регуляции L-изолейциновой, L-валиновой и L-лейциновой ветвей.



А



Б

Ферменты L-лизиновой (m—q) и L-метиониновой (r—v) ветвей катализируют реакции, приводящие в каждом случае к единственному конечному продукту, а их синтез специфически подавляется этими конечными продуктами (L-лизином и L-метионином соответственно).

Третья ветвь метаболического пути превращения аспарагиновой кислоты регулируется гораздо более сложным образом по двум причинам. Во-первых, L-треонин, который образуется в ходе реакций этой ветви, является одновременно предшественником белков и интермедиатом синтеза другой аминокислоты, L-изолейцина. Во-вторых, четыре из пяти ферментов (e—h), катализирующих синтез L-изолейцина из L-треонина, катализируют также аналогичные реакции совершенно другого биосинтетического пути, в ходе которого из пировиноградной кислоты синтезируется L-валин. Интермедиат этого последнего пути — α -кетонизовалериановая кислота — является также предшественником аминокислоты L-лейцина. Все эти взаимосвязи между реакциями показаны на рис. 8.13, А.

L-изолейцин является конечным продуктом, который ингибирует фермент d, катализирующий первую реакцию синтеза L-треонина; у этого фермента нет других биосинтетических функций. Конечный продукт L-валин ингибирует фермент e, выполняющий две метаболические функции, поскольку он катализирует реакции, участвующие в биосинтезе как изолейцина, так и валина. В некоторых штаммах *E. coli* этот фермент весьма чувствителен к ингибированию валином, поэтому присутствие экзогенного валина подавляет рост бактерий; влияние валина можно устранить путем одновременного введения в среду изолейцина. L-лейциновая ветвь пути биосинтеза валина регулируется конечным продуктом L-лейцином, ингибирующим активность первого фермента i, который функционирует только в этой ветви. Эти взаимосвязи изображены на рис. 8.13, Б.

ТАБЛИЦА 8.4
РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА ИЗОЛЕЙЦИНА, ВАЛИНА И ЛЕЙЦИНА С ПОМОЩЬЮ РЕПРЕССИИ¹

Ферменты	Конечные продукты, репрессирующие синтез ферментов
d, e, f, q, h i, j, jj, k, l	Изолейцин + Валин + Лейцин Лейцин

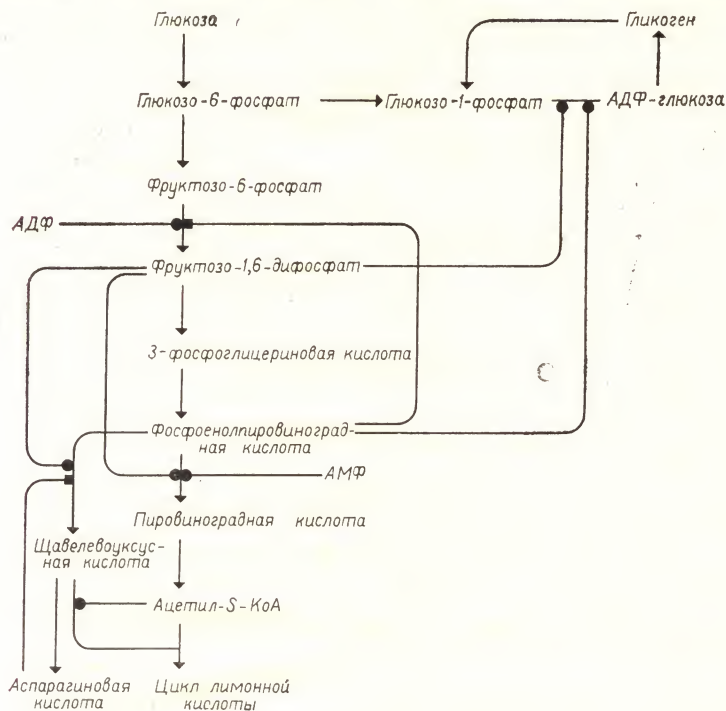
¹ См. рис. 8.13, Б.

Как показано в табл. 8.4, синтез многих ферментов, катализирующих реакции синтеза L-изолейцина, L-валина и L-лейцина, репрессируется только при совместном действии трех конечных продуктов; это явление называется *мультивалентной репрессией*. В то же время синтез пяти ферментов, участвующих в синтезе L-лейцина, специфически подавляется этой одной аминокислотой.

Рис. 8.14. Некоторые места аллостерической активации и ингибирования при синтезе запасного углевода гликогена и при расщеплении глюкозы у *E. coli*. Метаболиты, обладающие аллостерическим действием,

отмечены жирным шрифтом; реакции, на которые они воздействуют, обозначены следующим образом: —●— аллостерическая активация; —■— аллостерическое ингибирование. Обратите внимание, в частности, на

то, что накопление фруктозо-1,6-дифосфата и фосфоенолпирувиновой кислоты способствует превращению глюкозы в гликоген за счет аллостерической активации одного из ферментов синтеза гликогена.



Как указывалось выше, катаболические пути, осуществляемые конститутивными ферментами, регулируются исключительно посредством аллостерических воздействий на активность ферментов. Этот способ регуляции последовательных цепей реакций схематически изображен на рис. 8.14. на примере пути метаболизма глюкозы и синтеза гликогена у *E. coli*. Избыточные концентрации интермедиатов катаболизма фруктозо-1,6-дифосфата и фосфоенолпирувата сигнализируют о том, что поток углерода должен быть направлен в сторону синтеза гликогена.

РАЗНООБРАЗИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ У БАКТЕРИЙ

За небольшим исключением, биосинтетические пути у всех микроорганизмов в биохимическом отношении одинаковы. Однако у разных организмов данный путь биосинтеза может

контролироваться различными регуляторными механизмами, которые в общем характеризуются групповой специфичностью, что, вероятно, указывает на эволюционную близость организмов, принадлежащих к той или иной систематической группе. Некоторые примеры разнообразия регуляции путем ингибирования конечным продуктом приведены в табл. 8.5.

ТАБЛИЦА 8.5

ПРИМЕРЫ РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ МИКРООРГАНИЗМАМИ В ОТНОШЕНИИ РЕГУЛЯЦИИ НЕКОТОРЫХ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ РАЗВЕТВЛЕННЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ПО ПРИНЦИПУ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Фермент	Организм	Тип регуляции
Аспартокиназа	<i>E. coli</i> и другие энтеробактерии <i>Pseudomonas</i> spp.	Изофункциональные ферменты Согласованное ингибирование конечными продуктами
Синтетаза 7-фосфо-3-дезоксисарабиногептулозоновой кислоты (первый фермент пути синтеза ароматических аминокислот)	<i>E. coli</i> и другие энтеробактерии <i>Bacillus</i> spp.	Изофункциональные ферменты Последовательное ингибирование
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Согласованное ингибирование Кумулятивное ингибирование
Карбамоилфосфат-синтаза	<i>E. coli</i> и другие энтеробактерии <i>Pseudomonas putida</i>	Ингибирование и активация Ингибирование и активация
	<i>Neurospora</i>	Изофункциональные ферменты

Все бактерии, относящиеся к данной группе, могут обладать одинаковыми механизмами регуляции какого-либо фермента (в качестве примера назовем изофункциональные аспартокиназы, характерные для энтеробактерий), однако в той же группе бактерий ключевой фермент другого метаболического пути может регулироваться с помощью иного механизма (например, регуляция карбамоилфосфатсинтазы посредством множественного аллостерического контроля у энтеробактерий).

Многие катаболические пути также являются биохимически идентичными у целого ряда различных групп бактерий. И в этом случае действуют самые разнообразные механизмы регуляции, которым в то же время свойственна групповая специфичность. Например, путь, приводящий к β -кетoadипиновой кислоте, участвует в окислении ароматических субстратов в ряде групп бактерий. Он осуществляется строго индуцибельными ферментами, синтез которых у бактерий групп

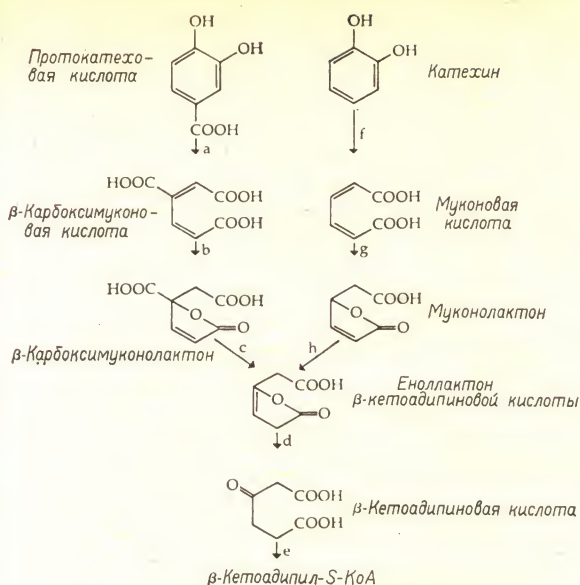


Рис. 8.15. Путь окисления протокатеховой кислоты и катехина до β -кетoadипиновой кислоты. Механизмы индукции ферментов (a—h) этих метаболических путей суммированы в табл. 8.6.

Pseudomonas и *Acinetobacter* регулируется сильно различающимися механизмами (рис. 8.15 и табл. 8.6). Различия связаны с химической природой метаболических индукторов, неодинаковой степенью координации механизмов регуляции и наличием или отсутствием изофункциональных ферментов.

ТАБЛИЦА 8.6
РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ ОКИСЛЕНИЯ ПРОТОКАТЕХОВОЙ КИСЛОТЫ И КАТЕХИНА ДО β -КЕТОАДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ У *ACINETOBACTER* И *PSEUDOMONAS*¹

<i>Pseudomonas</i>		<i>Acinetobacter</i>	
индуктор	фермент	фермент	индуктор
Протокатеховая кислота	a	a	Протокатеховая кислота
β -кетoadипиновая кислота или β -кетoadипил-S-КоА	b	b	
	c	c	
	d	d	
	e	e	
Муконовая кислота	f	f	Муконовая кислота
Муконовая кислота	g	g	Муконовая кислота
	h	h	
		d'	
		e'	

¹ Фигурной скобкой отмечены ферменты, которые индуцируются одновременно. Строчными буквами обозначены ферменты, катализирующие реакции, показанные на рис. 8.15; d' и e' — ферменты, изофункциональные d и e, но регулируемые независимо.

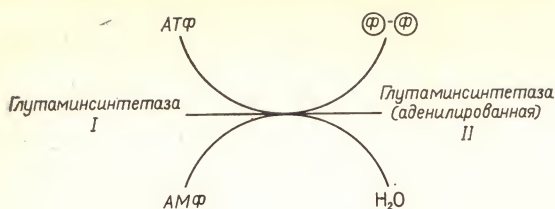


Рис. 8.16. Ковалентная модификация глутаминсинтетазы путем аденилирования, приводящая к снижению активности фермента, стимулируется высокой концентрацией аммиака. Аденилированная форма глутаминсинтетазы значительно более чувствительна к ингибированию конечными продуктами метаболизма глутамина, чем немодифицированная форма.

КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Как уже говорилось, активность аллостерических ферментов изменяется в результате конформационных изменений структуры фермента, индуцированных связыванием с небольшой молекулой эффектора; при переходе аллостерического фермента из одного состояния в другое ковалентные химические связи не образуются. Однако известно, что многие ферменты млекопитающих существуют в активной и неактивной формах, причем переход между ними происходит путем образования или расщепления ковалентных связей. В некоторых случаях, когда две формы фермента различаются числом содержащихся в них аминокислотных остатков, переход между ними осуществляется в результате гидролиза пептидной связи. В ряде случаев активные и неактивные формы различаются наличием или отсутствием каких-либо других химических групп, ковалентно связанных с белком. Поскольку переход между активным и неактивным состоянием происходит вследствие разрушения и образования ковалентных связей, он катализируется ферментом.

Глутаминсинтетаза *E. coli* — один из бактериальных ферментов, подвергающихся ковалентной модификации и изменяющих при этом свою активность (рис. 8.16). Две формы фермента различаются присутствием в одной из них адениловой группы, которая ферментативно присоединяется к белку или удаляется из него. Аденилированная форма фермента значительно менее активна, чем немодифицированная форма.

Следует подчеркнуть, что существование регуляции активности ферментов путем их ковалентной модификации не противоречит тому общему положению, что регуляция осуществляется аллостерическими белками. В самом деле, ферменты, катализирующие ковалентную модификацию других ферментов, сами аллостерически регулируются. В этом смысле ковалентную модификацию можно рассматривать как одно из проявлений аллостерической регуляции.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ДНК И ДЕЛЕНИЯ КЛЕТКИ

В гл. 7 синтез ДНК был описан как процесс, при котором нити двойной спирали расходятся и каждая из образующихся одиночных нитей служит матрицей для полимеризации дезоксирибонуклеотидов. Следует напомнить, что в процессе репликации в молекуле ДНК возникает *репликативная вилка*; по мере разделения цепей ДНК вилка продвигается, что сопровождается репликацией обеих цепей (рис. 7.43).

Синтез ДНК должен регулироваться с большой точностью, так как при делении каждая дочерняя клетка получает полный набор генетического материала. О тесной связи между синтезом ДНК и делением клеток свидетельствует то, что самые разнообразные химические вещества или мутации, ингибирующие синтез ДНК, одновременно подавляют деление клетки. Клетки, в которых подавлен синтез ДНК, удлиняются, но не делятся, что приводит в конечном счете к образованию очень длинных клеток (рис. 8.17).

Данные, полученные главным образом при исследовании *E. coli*, указывают, что распределение ДНК между дочерними клетками является просто следствием роста клетки. Кольцевая хромосома прикреплена к определенному участку цитоплазматической мембраны. После репликации новообразованная хромосома оказывается прикрепленной к соседнему участку мембраны. Эти два участка отделяются друг от друга благодаря росту находящейся между ними мембраны и последующему образованию перегородки между двумя хромосомами (рис. 8.18). Если репликация по какой-либо причине не закончилась, деления клетки не происходит. Видимо, имеется причинно-следственная связь между окончанием репликации хромосомы и последующим делением клетки: после завершения репликации хромосомы начинается ряд метаболических событий, которые в конце концов приводят к делению клетки. *Независимо от скорости роста деление клетки E. coli всегда происходит примерно через 20 мин после завершения репликации хромосомы* (при 37°C).

На рис. 8.18 показано также, что репликация является двунаправленной: образуются две репликативные вилки, которые движутся в противоположных направлениях вокруг хромосомы; когда они встречаются, репликация хромосомы заканчивается.

Время, которое требуется для полного удвоения ДНК (т. е. время, необходимое для того, чтобы одна из двух репликативных вилок прошла половину длины молекулы), составляет у *E. coli* около 40 мин при 37°C. Если организм растет в такой среде, что цикл роста и деления клетки длится более 40 мин, цикл синтеза ДНК все равно занимает толь-

Рис. 8.17. Фазово-контрастные (А и Б) и электронные (В и Г) микрофотографии *E. coli* В, иллюстрирующие влияние подавления синтеза ДНК на деление клеток. Специфическое ингибирование синтеза ДНК (в данном случае оно достигалось путем добавления митомцина С к экспоненциально расту-

щей культуре) не препятствует росту, но останавливает деление клеток. В результате бактерии, имеющие в норме вид коротких палочек (А), приобретают сильно удлинненную форму (Б). Электронные микрофотографии, сделанные до (В) и через 3 ч после (Г) добавления митомцина С, пока-

зывают, что количество ядерного материала (светлые участки в середине клеток) в присутствии антибиотика практически не увеличивается. [Suzuki H., Pangborn J., Kilgore W. W., Filamentous cells of *Escherichia coli* formed in the presence of mitomycin, J. Bacteriol., 93, 684 (1967).]

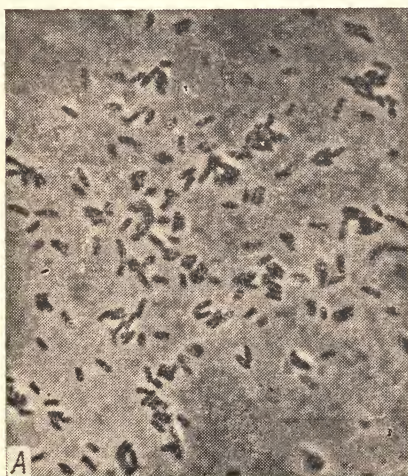
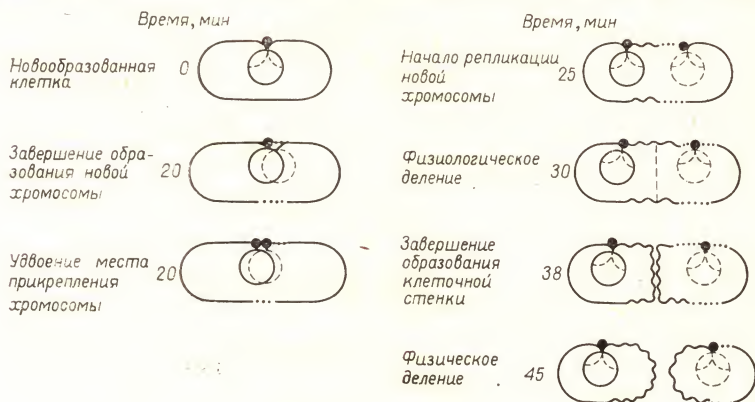


Рис. 8.18. Схема, иллюстрирующая взаимосвязь между репликацией ДНК, расхождением нуклеонидов, физиологическим делением и физическим делением клеток в культуре *E. coli*, растущей с временем удвоения 45 мин. Пунктирными линиями показаны участки стенки и мембраны, рост которых происходил пос-

ле появления нового места прикрепления хромосомы. Прерывистыми линиями обозначены образовавшиеся в результате репликации новые участки хромосомы. Волнистыми линиями показаны участки стенки и мембраны, рост которых происходил пос-

ле появления нового места прикрепления хромосомы. Перегородка, образовавшаяся через 30 мин, отмечена вертикальной прерывистой линией. [Clark D. J., The regulation of DNA replication and cell division in *E. coli* B/r, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 825 (1968).]



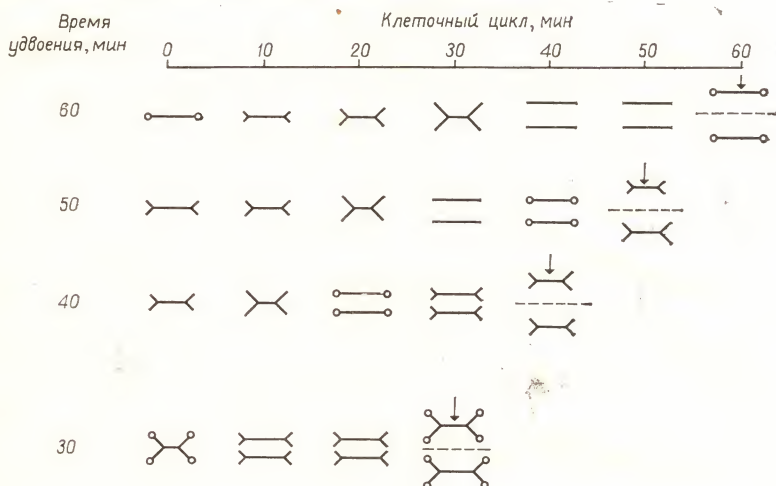
ко 40 мин; в остальное время клеточного цикла ДНК не синтезируется. Следовательно, синтез ДНК в медленно растущих клетках носит прерывистый характер. Однако в несинхронных культурах количество ДНК во всей популяции возрастает непрерывно, так как клетки находятся на различных стадиях цикла.

Таким образом, цикл деления состоит из двух периодов со строго определенной продолжительностью: времени, необходимого для репликации хромосомы, которое мы можем обозначить R , и времени между окончанием репликации и клеточным делением, которое мы обозначим D . В случае культуры *E. coli*, растущей при 37°C, R и D равны 40 и 20 мин соответственно (независимо от скорости роста). Как мы уже видели, периоды R и D могут совпадать или проходить последовательно. Если культура растет с временем удвоения (временем генерации), примерно равным R (рис. 8.19), то очередной цикл репликации хромосомы начинается и продолжается в течение предшествующего клеточному делению периода D продолжительностью 20 мин. При этих условиях в каждую дочернюю клетку попадает хромосома, уже содержащая две репликативные вилки. Если же время удвоения превышает 40 мин, часть периода D , в течение которого не происходит репликации хромосомы, увеличивается. Вследствие этого в момент деления дочерние клетки получают хромосомы со

Рис. 8.19. Схема сопряжения репликации хромосомы и клеточного деления в культуре *E. coli*, время удвоения которой различно. Кольцевая хромосома (здесь она представлена в виде

линейной молекулы, разорванной в точке начала репликации) всегда реплицируется в течение 40 мин (время R); через 20 мин (время D) происходит деление клетки (вертикальная стрел-

ка). Инициация репликации (обозначена кружками на концах молекул) всегда происходит за 60 мин ($R+D$) до деления.



все более укорачивающимися репликативными вилками. Если время генерации превышает $R+D$ (т. е. больше 60 мин), дочерние клетки получают хромосомы без репликативных вилок, так как реинициация репликации хромосомы всегда начинается за 60 мин до следующего клеточного деления.

Следовательно, в клетках, у которых время генерации равно или превышает R , координация синтеза ДНК и деления клетки достигается двумя путями: во-первых, репликация хромосомы начинается через промежутки времени, равные времени удвоения культуры, и, во-вторых, инициация синтеза происходит за 60 мин до деления клетки. Единственная переменная величина в этом процессе — время начала репликации хромосомы; R и D не изменяются. Оба правила соблюдаются и в случае применения богатых сред, в которых *E. coli* способна расти с временем генерации меньше R . Поскольку реинициация происходит через промежутки времени, равные времени генерации и меньшие, чем R , образуются *множественные вилки*, обеспечивающие такую скорость синтеза ДНК, которая соразмерна с высокой скоростью роста.

Соотношение инициации репликации хромосомы и клеточного деления при различных скоростях роста представлено на рис. 8.19. Легко видеть, что основными факторами являются *время* и *частота* инициации нового цикла репликации ДНК.

Для процесса инициации необходим синтез белка; при блокировании синтеза белка уже начатые циклы синтеза ДНК могут завершиться, но новый цикл не может начаться. Поэтому была выдвинута гипотеза о том, что инициация находится под позитивным контролем особого регуляторного белка — *инициатора*. Если концентрация инициатора возрастает до определенного порогового уровня, происходит инициация, после которой инициатор разрушается. Время, необходимое для достижения эффективной концентрации синтезируемого инициатора, в точности соответствует времени удвоения культуры. Эта гипотеза согласуется со всеми имеющимися данными, но до сих пор инициаторный белок не был обнаружен.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА РНК

Регуляция синтеза РНК разных типов осуществляется с помощью нескольких различных механизмов. Регуляция синтеза информационной РНК (мРНК) является важнейшим способом регуляции синтеза белка. Как мы уже видели, все механизмы индукции ферментов, репрессии конечным продуктом синтеза ферментов и катаболитной репрессии действуют посредством регуляции транскрипции, т. е. синтеза мРНК.

Регуляция синтеза стабильных молекул РНК [т. е. рибосомной РНК (рРНК) и транспортной РНК (тРНК)] осуществляется с помощью пока еще весьма малоизученных механизмов. Видимо, их синтез регулируется координированно, так как при самых разнообразных условиях среды, сильно влияющих на общее содержание РНК (табл. 8.1), внутриклеточное соотношение концентраций двух основных типов стабильных РНК остается постоянным. До сих пор нет сколько-нибудь удовлетворительного объяснения, почему при изменении скорости роста или быстрых изменениях состава среды происходят изменения концентрации стабильных РНК. В то же время твердо установлено два факта. Во-первых, концентрация непосредственных предшественников РНК, т. е. рибонуклеозидтрифосфатов, не влияет на регуляцию. Во-вторых, изменение скорости синтеза РНК связано с изменением числа участков (центров) полимеризации РНК; другими словами, скорость синтеза определяется числом молекул РНК-полимеразы, активно участвующих в полимеризации.

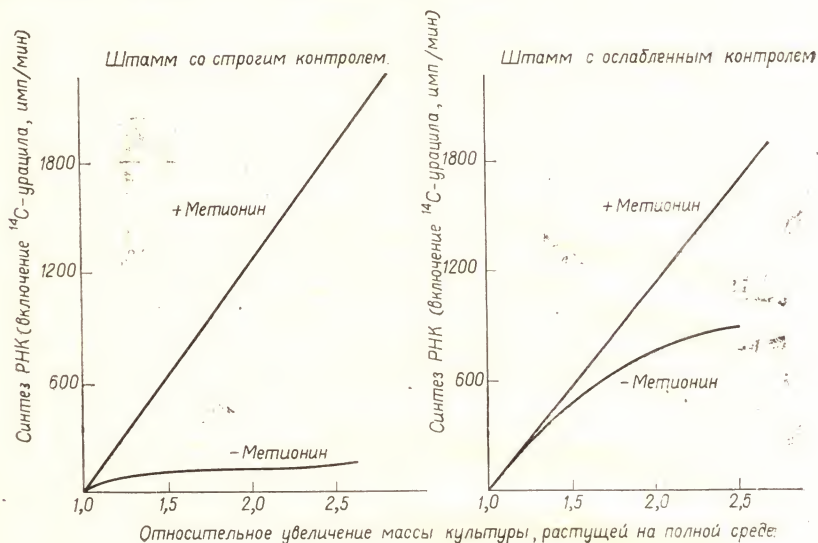
ЗАВИСИМОСТЬ СИНТЕЗА СТАБИЛЬНЫХ РНК ОТ СИНТЕЗА БЕЛКА

Около 20 лет назад А. Парди (A. Pardee) обнаружил, что в культурах *E. coli*, лишенных необходимых аминокислот, не только прекращается синтез белка, но также резко останавливается синтез стабильных РНК. Впоследствии были обнару-

Рис. 8.20. Влияние недостатка метионина в среде на биосинтез РНК у штаммов *E. coli* со строгим и ослабленным контролем. Оба штамма — аукоотрофы по метионину и потому не способны синтезировать белок,

если в среде не содержится этой аминокислоты; но в отличие от штамма со строгим контролем, который в отсутствие метионина практически не синтезирует стабильную РНК, штамм с ослабленным контро-

лем синтезирует в этих условиях значительное количество РНК, и скорость синтеза вначале не отличается от скорости синтеза РНК в присутствии метионина.



жены мутантные штаммы, у которых не было этой *строгой* зависимости синтеза РНК от способности клетки синтезировать белок. Мутантные штаммы, названные *штаммами с ослабленным контролем* (*relaxed*), генетически отличаются от родительских штаммов, которые называются *штаммами со строгим контролем* (*stringent*), наличием одной мутации, локализованной в гене *rel*. Штаммы с ослабленным контролем продолжают синтезировать значительные количества РНК в течение некоторого времени после того, как они были лишены какой-либо необходимой аминокислоты (рис. 8.20).

Вначале казалось, что из факта существования мутантов с ослабленным контролем следует, что ген *rel* кодирует регулятор, необходимый для синтеза стабильных РНК. Однако более поздние работы показали, что этот фактор регуляторно связан лишь с одним аспектом синтеза РНК, так как зависимость синтеза РНК от скорости роста в ослабленных штаммах остается нормальной. Продукт гена *rel*, по всей вероятности, предотвращает синтез РНК только при остановке синтеза белка. Продолжающийся синтез РНК после прекращения синтеза белка вреден для клетки; это доказывается тем фактом, что штаммы с ослабленным контролем, которые синтези-

ровали РНК в отсутствие необходимой аминокислоты в течение некоторого времени, при добавлении этой аминокислоты в среду снова начинают расти лишь после длительной задержки. Аминокислотное голодание вызывает быстрое накопление в клетках «строгих» штаммов двух необычных нуклеотидов — гуанозин-3',5'-ди(дифосфата) (ффГфф) и гуанозин-3'-дифосфат-5'-трифосфата (фффГфф), тогда как в штаммах с ослабленным контролем они не образуются. Эти соединения синтезируются рибосомами в присутствии АТФ из ГДФ и ГТФ соответственно. Хотя их функция точно не известна, имеются некоторые указания на то, что они играют важную роль в регуляции синтеза РНК.

Регуляция синтеза белков и нуклеиновых кислот имеет одно поразительное общее свойство: *скорость всех этих биосинтетических процессов регулируется путем изменения числа центров полимеризации, а не путем изменения концентрации субстратов*. Число репликативных вилок определяет скорость синтеза ДНК; число рибосом определяет скорость синтеза белка, и, наконец, число активных молекул РНК-полимеразы определяет скорость синтеза РНК.

ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

От внимания вдумчивого читателя не ускользнет, что регуляторные механизмы микроорганизмов обладают странным на первый взгляд свойством: *микроорганизмы ведут себя так, как будто у них есть определенная цель*. Такое поведение характерно для всех живых организмов, и его называют *целесообразным (телеономическим) поведением*. Совокупность протекающих в них процессов кажется направленной на выполнение предначертанного плана. В случае одноклеточного микроорганизма план, управляющий деятельностью организма, весьма прост; он удивительным образом раскрывается при анализе метаболической регуляции. Цель этого плана — использовать доступные для клетки в настоящий момент питательные вещества для образования двух клеток из одной с максимально возможной скоростью.

Со времен Аристотеля биологи размышляли о происхождении этого плана. Некоторым из них источник этого плана виделся в каком-то сверхъестественном действующем начале, лежащем вне биологического мира; другие приписывали его некой природной, хотя и мистической внутренней силе, которой обладают живые системы: таковы *энтелехия* Аристотеля и *жизненный порыв* или *жизненная сила* Бергсона.

Чарлз Дарвин был первым, кто попытался дать чисто научное объяснение целесообразности живых организмов. Концепция Дарвина, изложенная в общих чертах ниже, в настоящее время принята всеми биологами.

План возникает и затем постепенно с течением времени усложняется под влиянием естественного отбора, который действует, опираясь на небольшие наследуемые различия, появляющиеся благодаря мутациям в первоначально однородной популяции. В ходе естественного отбора сохраняются только те наследуемые изменения, которые увеличивают приспособленность организма к его окружению; при этом каждая деталь структуры, каждая функция любого организма постоянно подвергается испытанию.

Аллостерические белки — ключевые элементы метаболической регуляции — представляют собой один из самых замечательных примеров результата действия естественного отбора на молекулярном уровне. Едва ли можно сомневаться в том, что первоначально функция этих белков была чисто каталитической, а их аллостерические свойства были приобретены вторично. Благодаря мутациям, изменяющим структуру первоначальной каталитической белковой молекулы, на поверхности фермента случайно образовались дополнительные центры связывания, способные взаимодействовать с небольшими молекулами, отличными от субстрата. В очень редких случаях, когда эти структурные модификации увеличивают физиологическую эффективность действия фермента и, следовательно, приспособленность организма, в котором они возникают, естественный отбор обеспечивает их сохранение; все другие структурные модификации, снижающие физиологическую эффективность, элиминируются естественным отбором. Изучая сегодня свойства аллостерических белков, ученый занимается отдельными конечными продуктами этой молекулярной эволюции, которые в течение длительного времени отбирались и совершенствовались под действием естественного отбора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Maaløe O., Kjeldgaard N.*, 1965, Control of Macromolecule Synthesis, New York, Benjamin.
Mandelstam J., McQuillen K., 1973, Biochemistry of Bacterial Growth, 2nd ed., New York, Wiley.
Monod J., 1971, Chance and Necessity, An Essay on the Natural Philosophy of Modern Biology (translated from the French), New York, Knopf.

Обзоры

- Edlin G., Broda R.* (1968), Physiology and Genetics of the Ribonucleic Acid Control Locus in *Escherichia coli*, Bact. Revs., 32, 206.

9 РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

В этой главе будут описаны методы, применяемые для измерения роста микроорганизмов, а также различные стадии и способы роста. Внимание будет сосредоточено на одноклеточных бактериях, так как они представляют собой идеальный объект для исследования процессов роста и широко используются для изучения природы этих процессов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОСТА

В любой биологической системе рост может быть определен как согласованное увеличение количества всех химических компонентов. Возрастание массы не обязательно связано с ростом, поскольку клетки способны просто накапливать запасные вещества, такие, как гликоген или поли- β -оксибутират. Однако в подходящей среде, к которой они полностью адаптированы, бактерии находятся в состоянии *сбалансированного роста*. В период сбалансированного роста удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции, например количества белка, РНК, ДНК и внутриклеточной воды. Иными словами, культуры, растущие сбалансированно, сохраняют постоянный химический состав. Явление сбалансированного роста упрощает задачу измерения скорости роста бактериальной культуры; так как скорость прироста *всех* компонентов популяции одна и та же, то для определения скорости роста достаточно измерить прирост *любого* компонента.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ВЫРАЖЕНИЕ РОСТА

Бактериальная культура, растущая сбалансированно, имитирует автокаталитическую химическую реакцию первого порядка, т. е. скорость прироста вещества клеток в любой данный момент пропорциональна числу или массе имеющихся в это время бактерий.

Скорость прироста клеток $= \mu$ (число или масса клеток) (9.1)

Коэффициент пропорциональности μ является индексом скорости роста и называется *удельной скоростью роста*. Поскольку мы принимаем, что рост сбалансирован, μ показывает также отношение прироста любого данного клеточного компонента к исходному количеству этого компонента, что

можно выразить в математической форме:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N, \quad \frac{dX}{dt} = \mu X, \quad \frac{dZ}{dt} = \mu Z, \quad (9.2)$$

где N — число клеток в 1 мл, X — масса клеток в 1 мл, Z — количество любого клеточного компонента в 1 мл, t — время и μ — удельная скорость роста. Действительно, эти уравнения точно описывают рост большинства культур одноклеточных бактерий. На практике удобнее использовать другие (недифференциальные) формы этих уравнений. В результате интегрирования уравнения (9.2) получаем

$$\ln Z - \ln Z_0 = \mu(t - t_0), \quad (9.3)$$

а после перевода натуральных логарифмов в десятичные

$$\lg Z - \lg Z_0 = \frac{\mu}{2,303}(t - t_0), \quad (9.4)$$

где величины Z и Z_0 представляют количество любого компонента бактериальной культуры в моменты времени t и t_0 соответственно. Измеряя Z и Z_0 , можно вычислить величину μ — удельную скорость роста культуры. Таким образом, если культура содержит 10^4 клеток в 1 мл в момент t_0 и 10^8 клеток в 1 мл через 4 ч, удельная скорость роста культуры равна

$$\mu = \frac{(8 - 4) 2,303}{4} = 2,303 \text{ ч}^{-1}. \quad (9.5)$$

Величины μ достаточно для определения скорости роста культуры. Однако обычно используют и некоторые другие параметры. Одним из них служит среднее время удвоения биомассы, или время генерации (g), определяемое как период, необходимый для увеличения в два раза количества всех компонентов культуры¹.

Взаимосвязь между g и μ можно вывести из уравнения (9.3), так как, если рассматриваемый интервал времени ($t - t_0$) равен g , то Z будет равно $2Z_0$. Сделав эти подстановки, получим

$$\mu = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0,693}{g}. \quad (9.6)$$

В выбранном нами примере среднее время удвоения культуры g равно $0,693/2,303$, т. е. 0,42 ч или 25 мин. Это относительно высокая скорость роста для бактерий, как показывают примеры, представленные в табл. 9.1.

¹ Иногда в качестве коэффициента скорости роста используют величину, обратную времени удвоения. Этот коэффициент (k) численно равен μ и может ввести в заблуждение, поэтому его применения следует избегать.

ТАБЛИЦА 9.1

МАКСИМАЛЬНАЯ ЗАРЕГИСТРИРОВАННАЯ СКОРОСТЬ РОСТА НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ В СЛОЖНЫХ СРЕДАХ (ЕСЛИ НЕТ ДРУГИХ УКАЗАНИЙ) ПРИ ОПТИМАЛЬНОЙ ИЛИ БЛИЗКОЙ К ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Организм	Температура, °С	Время удвоения биомассы, ч
<i>Beneckea natriegens</i>	37	0,16
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	60	0,14
<i>Escherichia coli</i>	40	0,35
<i>Bacillus subtilis</i>	40	0,43
<i>Pseudomonas putida</i>	30	0,75 ¹
<i>Vibrio marinus</i>	15	1,35
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	30	2,2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37	~6
<i>Nitrobacter agilis</i>	27	~20 ¹

¹ Выращен в синтетической среде.

Вышеприведенные математические выражения для скорости роста бактерий получены на основе предположения, что скорость прироста пропорциональна числу (или массе) клеток, имеющих в каждый данный момент. Как показывает уравнение (9.6), из этого предположения следует также, что в период сбалансированного роста время удвоения (g) есть величина постоянная. Те же уравнения можно получить, предположив, что среднее время удвоения — величина постоянная, и это приведет к заключению, что скорость прироста числа (или массы) клеток пропорциональна их числу (или массе) в любой данный момент.

КРИВАЯ РОСТА

Уравнение (9.4) предопределяет прямолинейную зависимость между логарифмом числа клеток (или любым другим измеряемым параметром популяции) и временем (рис. 9.1, А) с наклоном прямой, соответствующим $\mu/2,303$, и отсекаемым ею на ординате отрезком, равным $\log N_0$. Взяв антилогарифм, уравнение (9.4) можно написать в экспоненциальной форме:

$$Z = Z_0 10^{\mu(t-t_0)/2,303}. \quad (9.7)$$

В нем выражена экспоненциальная связь между числом клеток в популяции (или любым другим измеряемым параметром популяции) и временем (рис. 9.1, Б). О популяции бактерий, развитие которой подчиняется этим уравнениям, говорят, что она находится в *экспоненциальной фазе* роста.

Экспоненциальный рост с высокими скоростями обычно не поддерживается в микробной популяции длительное время. Причина этого становится очевидной, если рассмотреть по-

Рис. 9.1. Сравнение способов графического изображения данных о росте бактериальной культуры. А. Логарифм плотности (числа клеток в 1 мл, N) сбалансированно растущей культуры

как функция времени представляет собой прямую линию, наклон которой соответствует удельной скорости роста (μ), деленной на 2,303, а отсекаемый ею отрезок на оси ординат равен

$\log N_0$. Б. Прямые данные о плотности клеточной популяции, представленные на графике как функция времени, дают экспоненциальную кривую.

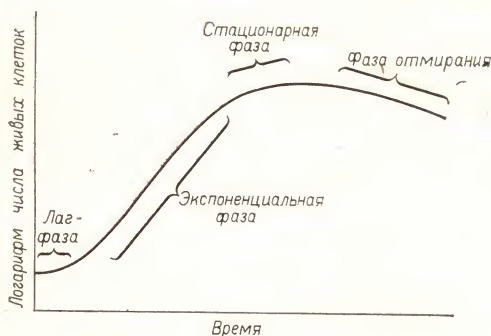
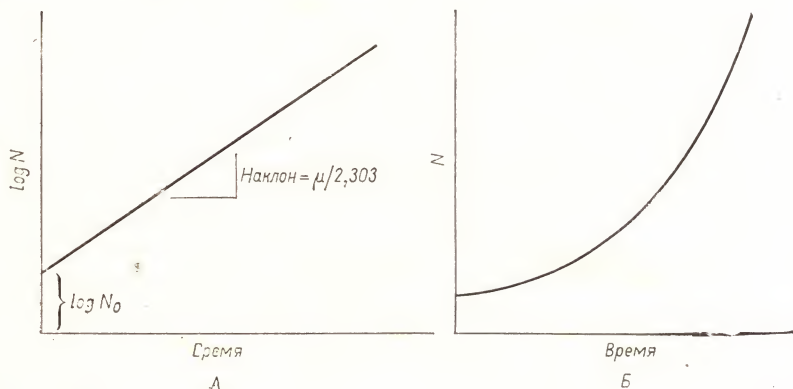


Рис. 9.2. Обобщенная кривая роста бактериальной культуры.

следствия такого роста. Единственная бактерия, у которой время удвоения равно 20 мин, через 48 ч экспоненциального роста дала бы потомство весом $2,2 \cdot 10^{31}$ г, что приблизительно в 4000 раз больше веса Земли.

В норме рост бактериальных популяций ограничивается вследствие истощения доступных источников питания или накопления токсичных продуктов обмена веществ. В результате этого скорость роста снижается, и в конечном счете рост прекращается. Говорят, что культура в этот момент находится в *стационарной фазе* (рис. 9.2). Переход из экспоненциальной фазы в стационарную включает период *несбалансированного роста*, когда разные клеточные компоненты синтезируются с различными скоростями. Поэтому в стационарной фазе химический состав клеток отличается от их состава

в экспоненциальной фазе. Хотя состав клеток в стационарной фазе зависит от определенного фактора, ограничивающего рост, для них характерны и некоторые общие свойства. Так, по сравнению с клетками, находящимися в экспоненциальной фазе, клетки стационарной фазы меньше по размеру (поскольку клеточное деление продолжается и после прекращения увеличения массы); они более устойчивы к физическим воздействиям (нагревание, охлаждение, облучение) и химическим агентам.

ФАЗА ОТМИРАНИЯ

Если бактериальные клетки находятся в таких условиях, которые не поддерживают их рост, то в конечном счете они отмирают. Их гибель является результатом действия ряда факторов, одним из которых, имеющим важное значение, является истощение запасов энергии в клетке. Отмирание, подобно росту, описывается экспоненциальной функцией, поэтому на графике, построенном в полулогарифмическом масштабе (рис. 9.2), фаза отмирания изображается линейным уменьшением во времени числа *жизнеспособных* клеток. Скорость отмирания бактерий широко варьирует в зависимости от условий и особенностей организма (например, энтеробактерии отмирают медленно в отличие от некоторых видов *Bacillus*, которые отмирают быстро).

ЛАГ-ФАЗА

При перенесении клеток из культуры, находящейся в стационарной фазе, в свежую среду того же состава они приобретают способность к возобновлению роста только после определенного периода, в течение которого происходит изменение их химического состава. Продолжительность этого периода адаптации, называемого *лаг-фазой* (рис. 9.2), может быть самой различной, но обычно его длительность прямо пропорциональна длительности предшествующей стационарной фазы.

ЛИНЕЙНЫЙ РОСТ

В некоторых случаях кинетика бактериального роста является линейной, а не экспоненциальной. В этих условиях скорость прироста постоянна, т. е.

$$\frac{dN}{dt} = C, \quad (9.8)$$

или после интегрирования

$$N = Ct. \quad (9.9)$$

Линейной функцией времени (t) является число клеток (N), а не логарифм этого числа.

К линейному росту может приводить ряд условий. Например, если бактерия, нуждающаяся в никотиновой кислоте как факторе роста, лишена этого соединения, она не способна

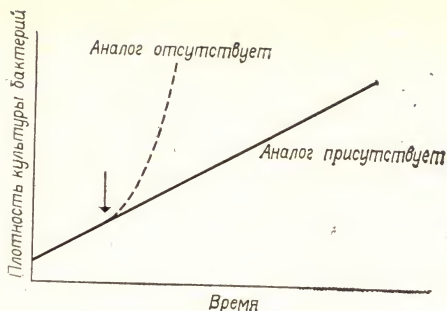


Рис. 9.3. Линейный рост *E. coli* в среде, содержащей аминокислотный аналог *n*-фторфенилаланин (сплошная линия). Аналог добавлен в момент, указанный вертикальной стрелкой. Пунктирная линия показывает рост параллельной культуры, не содержащей *n*-фторфенилаланина.

синтезировать никотинамиднуклеотидные коферменты, для которых никотиновая кислота служит специфическим биосинтетическим предшественником. В связи с участием никотинамиднуклеотидных коферментов в переносе электронов их уровень в клетке определяет общую скорость метаболизма, а следовательно, и роста. Если дальнейший синтез этих компонентов прекращается, то скорость роста популяции становится прямо пропорциональной запасам никотинамиднуклеотидных коферментов в клетках, а общая каталитическая активность больше не возрастает. Поэтому и скорость увеличения числа клеток остается постоянной. Введение в культуру *n*-фторфенилаланина, аналога природной аминокислоты фенилаланина, также приводит к ее линейному росту (рис. 9.3). Аналог достаточно близок к природной аминокислоте и может включаться во вновь синтезированные белки вместо фенилаланина. Однако белки, содержащие *n*-фторфенилаланин, в основном не являются функционально активными, а следовательно, не увеличивают каталитической активности клетки. В результате скорость роста не может превысить предела, определяемого каталитической активностью клеток в момент введения в культуру аналога фенилаланина.

Некоторые мутации, препятствующие в определенных условиях дальнейшему синтезу необходимого белка, также приводят к линейному росту культуры, помещенной в эти условия.

ИЗМЕРЕНИЕ РОСТА

Следить за ростом необходимо с помощью количественных измерений. Как уже упоминалось выше, экспоненциальный рост обычно сбалансирован, поэтому для определения скорости роста можно измерять любое свойство биомассы. Для удобства обычно измеряют массу или число клеток.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МАССЫ

Единственный прямой способ измерения клеточной массы — это определение веса сухого вещества клеток, содержащихся в определенном объеме культуры, путем отделения их от сре-

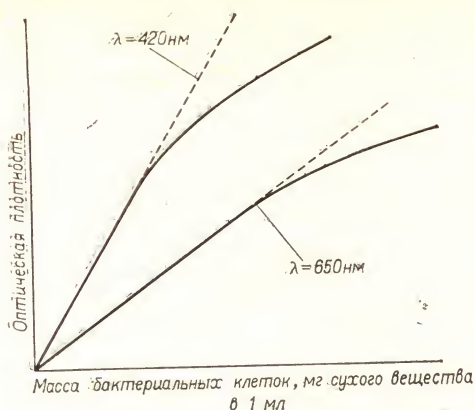


Рис. 9.4. Зависимость между оптической плотностью суспензии бактерий и массой бактериальных клеток. Видно, что прямая пропорциональность наблюдается только при низких величинах оптической плотности, а при высоких происходит отклонение от прямой пропорциональности (пунктирная линия); видно также, что измерения более чувствительны при использовании света с более короткой длиной волны (λ).

ды, высушивания и последующего взвешивания. Такие определения занимают много времени и относительно мало чувствительны. С помощью обычных весов трудно точно определить вес, не превышающий 1 мг; между тем такое количество сухого вещества может содержать до 5 млрд. бактерий.

Лучшим методом определения массы одноклеточных микроорганизмов является оптический метод — измерение количества света, рассеянного суспензией клеток. Он основан на том, что рассеяние света мелкими частицами в определенных пределах пропорционально их концентрации. Когда луч света проходит через суспензию бактерий, он частично рассеивается и доля пропущенного света служит мерой плотности суспензии. Такие измерения обычно делают с помощью спектрофотометра. Этот прибор показывает единицы *оптической плотности* (D); оптическая плотность представляет собой логарифм отношения интенсивности света, падающего на суспензию (I_0), к интенсивности пропущенного ею света (I):

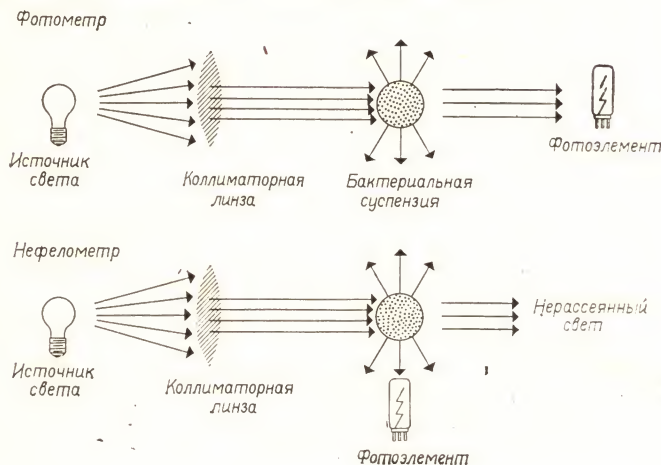
$$D = \log \frac{I_0}{I}. \quad (9.10)$$

Спектрофотометр удобен для определения плотности клеточных суспензий. Когда он откалиброван по бактериальным суспензиям известной плотности (рис. 9.4), то позволяет точно и быстро определить вес сухой биомассы в единице объема культуры. Необходимо подчеркнуть, что измерения плотности клеточных суспензий имеют смысл только при сравнении со стандартной кривой, подобной той, которая приведена на рис. 9.4. Так как рассеяние обратно пропорционально четвертой степени длины волны рассеиваемого света, чувствительность измерений резко возрастает при использовании излучения с более короткими длинами волн; однако обычно нижний предел чувствительности данного метода достигается при измерении плотности бактериальных суспензий, содержащих

Рис. 9.5. Сравнение расположения компонентов оптической схемы в фотометре и в нефелометре.

Более высокая чувствительность нефелометра обусловлена измерением рассеянного, а

не остаточного нерассеянного света.



около 10 млн. клеток в 1 мл. Более чувствительные приборы для измерения светорассеяния называются *нефелометрами*. В них светочувствительное устройство расположено под прямым углом к падающему лучу света и поэтому прямо измеряет рассеянный свет (рис. 9.5).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА КЛЕТОК

Число одноклеточных организмов в суспензии можно определить микроскопически, подсчитав отдельные клетки в точно измеренном очень малом объеме. Такой подсчет обычно делают на специальных предметных стеклах — *счетных камерах*. На них начерчены квадраты известной площади, и их конструкция позволяет внести между предметным и покровным стеклами слой жидкости известной толщины. Следовательно, можно точно вычислить объем жидкости, покрывающей каждый квадрат. Такой прямой подсчет называют *определением общего числа клеток*. Он учитывает как живые, так и мертвые клетки, поскольку их нельзя различить при микроскопическом исследовании, по крайней мере в случае бактерий.

Основное ограничение прямого микроскопического подсчета численности бактериальных популяций — необходимость иметь относительно высокие концентрации клеток в суспензии. Большое увеличение, позволяющее регистрировать бактерии, в то же время ограничивает объем жидкости, который можно подвергнуть тщательному исследованию под микроскопом. Тем не менее в известном объеме должно содержаться достаточное число клеток, чтобы сделать подсчет статистически значимым. В результате данным методом можно анализи-

ровать с любой степенью точности только те суспензии, которые содержат не менее 10 млн. клеток в 1 мл.

Для прямого подсчета клеток в суспензии используют также электронный прибор, названный по имени его изобретателя *счетчиком Коултера*. Порцию суспензии пропускают через очень тонкое отверстие в небольшой стеклянной трубке. Это отверстие служит, кроме того, и для замыкания электрического тока, проходящего через среду между электродами, расположенными внутри трубки и на ее внешней поверхности. Определение основано на различии в проводимости между бактерией и окружающей средой. Каждый раз, когда бактериальная клетка проходит через отверстие, проводимость падает, что обнаруживается и регистрируется электронным счетчиком. Прибор может различать величину и длительность изменений проводимости и таким образом регистрировать и записывать не только число клеток в популяции, но и распределение их по размеру. Отверстие, обычно используемое для подсчета бактерий, имеет диаметр 30 мкм, поэтому среда, в которой находятся клетки, должна быть тщательно освобождена от посторонних частиц (например, пыли), так как мельчайшие из них будут подсчитаны как бактерии, а более крупные закупорят отверстие.

Число одноклеточных организмов можно подсчитать также после их *высева в чашки Петри*, поскольку жизнеспособные клетки, пространственно отделенные друг от друга во всем объеме агаризованной среды или на ее поверхности, в процессе роста образуют отдельные макроскопические колонии. Следовательно, приготовив соответствующие разведения бактериальной популяции и использовав их для засева подходящей среды, можно определить число жизнеспособных клеток в исходной популяции путем подсчета числа вырастающих после инкубации колоний и умножения этой цифры на коэффициент разведения. В отличие от прямого микроскопического или электронного подсчета такой метод обычно называют определением *числа жизнеспособных клеток*, поскольку он позволяет учесть только те клетки, которые могут расти на использованной для посева среде. Определение числа жизнеспособных клеток, несомненно, является наиболее чувствительным методом количественного учета бактерий, так как он дает возможность зарегистрировать даже единичную жизнеспособную клетку в суспензии. Его точность зависит от соблюдения некоторых предосторожностей. Необходимо подсчитать большое число колоний, желательно в двух или трех чашках, содержащих каждая по несколько сотен колоний (стандартная ошибка приблизительно равна квадратному корню из числа подсчитанных колоний). При определении числа клеток в растущей культуре важно понимать, что в процессе разбавления оно продолжает увеличиваться, даже если для разбавления используется среда, недостаточная для обес-

Рис. 9.6. Определение жизнеспособности микроорганизмов путем комбинирования выращивания и микроскопического наблюдения. Образец культуры распределяют поверх тонкого слоя агаризованной среды и фотографируют



после проведения инкубации в течение 3,5 ч. Жизнеспособные клетки образуют микроколонии. [Postgate J. R., Crumpton J. E., Hunter J. R., The measurement of bacterial viabilities by slide culture, J. Gen. Microbiol., 24, 15 (1961).]

печения непрерывного роста. Рост клеток нельзя затормозить, не оказывая влияния на их жизнеспособность. Быстрое охлаждение перед разбавлением или во время него в некоторых случаях может вызвать гибель значительной части популяции — явление, называемое *холодовым шоком*.

Для установления доли жизнеспособных клеток в популяции можно использовать методы отдельного определения общего числа клеток и числа жизнеспособных клеток. Долю жизнеспособных клеток определяют также непосредственно с помощью иного метода, сочетающего микроскопическое наблюдение и выращивание клеток. Для этого соответствующим образом разбавленный образец наносят поверх тонкого слоя агаризованной среды, помещенной на стерильное предметное стекло, которое инкубируют до тех пор, пока не произойдет нескольких клеточных делений, а затем просматривают под микроскопом, используя метод фазового контраста. В этих условиях можно легко обнаружить жизнеспособные клетки, образующие микроколонии, и точно определить их долю относительно оставшихся одиночными нежизнеспособных клеток (рис. 9.6).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РОСТА: ЭКОНОМИЧЕСКИЙ КОЭФФИЦИЕНТ

Урожай бактериальной культуры — это разность между массой (или числом) клеток, имеющихся в культуре, вступившей в стационарную фазу, и массой (или числом) клеток, внесенных в среду с инокулятом. Если рост ограничен определенным субстратом, то между начальной концентрацией внесенного в среду лимитирующего субстрата и полученным общим урожаем существует постоянная линейная зависимость, показанная на рис. 9.7. Поэтому масса клеток, образованная на единицу лимитирующего субстрата, представляет собой константу — *экономический коэффициент*, или *выход биомассы* (Y). Величина Y может быть вычислена из отдельного определения общего урожая по уравнению

$$Y = \frac{X - X_0}{C}, \quad (9.11)$$

48 где X — вес сухого вещества клеток в 1 мл культуры, всту-

Рис. 9.7. Зависимость между общим урожаем аэробной бактерии (*Pseudomonas* sp.) и начальной концентрацией лимитирующего субстрата

(фруктозы). Опыты проведены в синтетической среде с фруктозой в качестве единственного источника углерода и энергии. Наклон кривой

равен экономическому коэффициенту (Y) данной бактерии в присутствии фруктозы (см. текст).



пившей в стационарную фазу, X_0 — вес сухого вещества клеток в 1 мл сразу после инокуляции среды и C — концентрация лимитирующего субстрата.

Вычислив однажды экономический коэффициент для любого необходимого субстрата, можно в дальнейшем использовать его для расчета концентрации этого субстрата в смеси неизвестного состава. Для этого измеряют урожай, который обеспечивает определенный объем этой смеси, добавленный к среде, не содержащей лимитирующего субстрата, но полноценной во всех других отношениях. Такой способ называется *биологическим определением (биопробой)*. Его широко использовали в прошлом для измерения концентрации аминокислот и витаминов в пищевых продуктах. В настоящее время для этих целей применяют химические и физические методы, получившие общее признание, однако принцип биологического определения остается важным способом выявления и измерения веществ, способных стимулировать рост организмов. Для проведения биологического определения требуется только штамм микроорганизма, для которого испытываемое вещество является необходимым субстратом (гл. 31).

В случае хемогетеротрофной бактерии экономический коэффициент, измеренный исходя из потребленного органического субстрата, становится показателем эффективности превращения субстрата в бактериальную массу. Данные, представленные на рис. 9.7, получены для облигатноаэробной хемогетеротрофной псевдомонады, растущей на синтетической среде с фруктозой в качестве единственного источника углерода и энергии. Согласно этому графику, экономический коэффициент приблизительно равен 0,4. Учитывая, что содер-

жание углерода во фруктозе и в веществе клетки составляет соответственно 40 и 50%, можно рассчитать, что в углерод клетки превращается около половины углерода фруктозы. Следовательно, данный микроорганизм расходует около половины углерода фруктозы на образование клеток, а другую половину окисляет до CO_2 . Аналогичные опыты с другими аэробными хемогетеротрофами, использующими сахара в качестве единственного источника углерода, показывают, что эффективность превращения углерода сахара в углерод клеток варьирует приблизительно от 20 до 50%. По-видимому, эта разница отражает различия в эффективности образования АТФ при катаболизме субстрата; данные в пользу этого вывода приведены ниже.

При выращивании в богатых средах некоторых микроорганизмов, способных существовать только за счет брожения (облигатных анаэробов), с помощью радиоактивных индикаторов обнаружен лишь незначительный переход углерода сбраживаемого субстрата в вещество клеток или полное отсутствие такого перехода. В этих условиях вещество клеток образуется из других компонентов среды (аминокислот, пуринов, пиримидинов и т. д.), а сбраживаемый субстрат служит только источником энергии. Для многих типов брожения выход АТФ известен так же, как урожай клеток, который

ТАБЛИЦА 9.2

ЭКОНОМИЧЕСКИЙ КОЭФФИЦИЕНТ, ИЗМЕРЕННЫЙ У МИКРООРГАНИЗМОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ БРОЖЕНИЕ, В РАСЧЕТЕ НА ИСПОЛЬЗОВАННУЮ ГЛЮКОЗУ ИЛИ ОБРАЗОВАВШИЙСЯ АТФ

Организм	Тип брожения и его механизм	Количество молей АТФ, образованных на 1 моль расщепленной глюкозы	Молярный экономический коэффициент, выраженный в граммах клеток, образованных на 1 моль	
			расщепленной глюкозы	образованного АТФ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи)	Спиртовое, путь Эмбдена — Мейергофа	2	21	10,5
<i>Streptococcus faecalis</i>	Гомоферментативное молочнокислое, путь Эмбдена — Мейергофа	2	22	11,0
<i>Lactobacillus delbruckii</i>	Гомоферментативное молочнокислое, путь Эмбдена — Мейергофа	2	21	10,5
<i>Zymomonas mobilis</i>	Спиртовое, путь Энтнера — Дудорова	1	8,6	8,6

составляет приблизительно 10 г сухого вещества на 1 моль образовавшегося АТФ ($Y_{\text{АТФ}}$), что свидетельствует о незначительном варьировании у микроорганизмов количества энергии, затрачиваемой на полимеризацию углеродных мономеров в макромолекулы. При расчете урожая клеток на *моль использованного при брожении субстрата* такое постоянство не обнаруживается, поскольку пути сбраживания одного и того же субстрата разными микроорганизмами могут различаться по выходу АТФ. Например, у *Zygotomonas mobilis* сбраживание глюкозы в этиловый спирт идет по пути Энтнера—Дудорова с образованием 1 моля АТФ на 1 моль расщепленной глюкозы; в то же время дрожжи для осуществления этого процесса используют путь Эмбдена—Мейергофа, причем на 1 моль глюкозы образуется 2 моля АТФ. В результате дрожжи дают значительно больше клеток, чем *Zygotomonas*, в расчете на 1 моль сброженной глюкозы, но приблизительно то же самое количество на 1 моль образовавшегося при брожении АТФ (табл. 9.2). Относительное постоянство $Y_{\text{АТФ}}$ может быть использовано для оценки выхода АТФ в каком-либо еще не изученном пути диссимиляции.

СИНХРОННЫЙ РОСТ

До сих пор мы рассматривали характерные особенности роста бактериальной *популяции*. Такие исследования не позволяют сделать заключение о поведении индивидуальных клеток в процессе роста, так как у большинства бактериальных культур распределение клеток по размеру (а следовательно, и по возрасту) имеет совершенно случайный характер. Информацию о поведении отдельных бактерий в процессе роста можно получить при изучении *синхронных культур*, т. е. культур, в которых все клетки находятся на одинаковой стадии клеточного цикла. Результаты опытов, проведенных на таких культурах, равноценны данным о поведении индивидуальных клеток.

Существует ряд методов, с помощью которых получают синхронные культуры бактерий. Синхронность можно *индуцировать* путем изменений (обычно циклических) окружающих условий. У некоторых бактерий синхронность вызывают повторными изменениями температуры или внесением свежих питательных веществ в культуры, которые только что достигли стационарной фазы. Кроме того, синхронную популяцию клеток можно получить из неупорядоченной популяции в результате *отбора*, физически отделяя клетки, находящиеся на одной и той же стадии клеточного цикла. Это осуществляют путем дифференциального фильтрования или центрифугирования. Для физиологических исследований методы с применением селекции предпочтительнее методов, в которых для получения синхронных культур используется индукция, поскольку

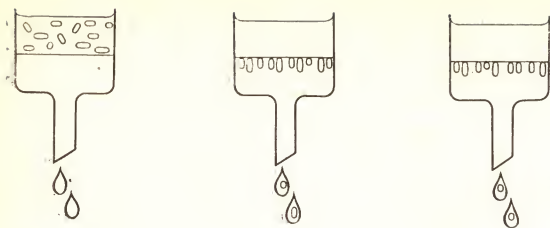


Рис. 9.8. Получение синхронных культур методом Хельмштеттера—Каммингса.

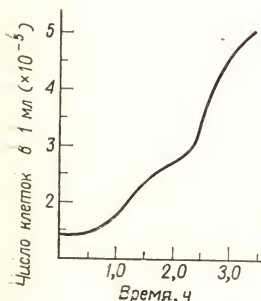


Рис. 9.9. Синхронный рост культуры *E. coli* в минимальной среде, содержащей глюкозу. Элюат мембранной культуры (метод Хельмштеттера—Каммингса) собирали в течение 3 мин и инкубировали при 30 °С. (Marr

A. G., Painter P. R., Nilson E. H., Growth and Division of Individual Bacteria, in Microbial Growth, 19th Symposium of the Society of General Microbiology, Cambridge, England, Cambridge University Press, 1969.)

метод индукции может вызвать циклические изменения, не типичные для нормального клеточного цикла.

Прекрасным селективным способом получения синхронных культур является метод Хельмштеттера — Каммингса, основанный на том, что некоторые бактерии прочно удерживаются фильтрами (миллиметровыми) из нитрата целлюлозы. Метод заключается в фильтровании несинхронизированной культуры бактерий через миллиметровый фильтр, который затем переворачивают и осторожно промывают свежей средой (рис. 9.8). После смывания с фильтра слабо связанных бактерий поток проходящей через фильтр среды содержит только клетки, образующиеся в результате деления. Следовательно, в смыве присутствуют лишь вновь образованные клетки, находящиеся на одной и той же стадии клеточного цикла.

На рис. 9.9 показан рост культуры *E. coli*, синхронизированной таким способом. В течение примерно одного часа вновь образованные клетки увеличиваются в размере; поэтому их число в культуре остается приблизительно постоянным. Затем происходит довольно резкое удвоение числа клеток. Во втором цикле деления образуется менее четкое плато, а возрастание популяции занимает больший период, что указывает на снижение степени синхронности. В третьем цикле деления признаки синхронности почти не сохраняются.

Синхронные культуры быстро утрачивают синхронность, потому что не все клетки популяции делятся, достигнув одного и того же размера, возраста или момента времени, прошедшего после предыдущего деления. Скорость потери синхронности позволяет рассчитать *распределение клеток по возра-*

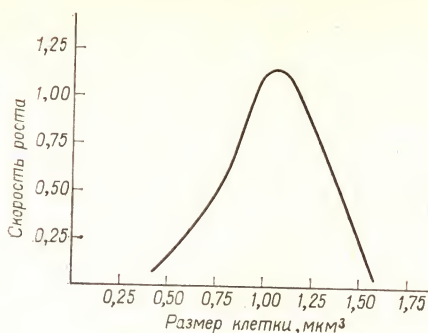


Рис. 9.10. Скорость роста ($\text{мкм}^3/\text{час}$) индивидуальных клеток *E. coli*, выращиваемых в синтетической среде, как функция размера клетки (мкм^3). (Marr A. G., Painter P. R., Nilson E. H., Growth and Division of Individual Bacteria, in Microbial Growth, 19th Symposium of the Society of General Microbiology. Cambridge, England, Cambridge University Press, 1969).

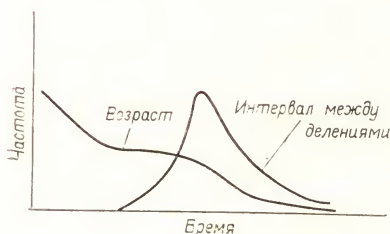


Рис. 9.11. Сравнение распределения величины интервала между делениями и возраста клеток в экспоненциально растущей популяции *E. coli*. (Marr A. G., Painter P. R., Nilson E. H., Growth and Division of Individual Bacteria, in Microbial Growth, 19th Symposium of the Society of General Microbiology. Cambridge, England, Cambridge University Press, 1969).

сту в момент деления. Используя электронные методы подсчета, можно установить *распределение клеток по размеру в экспоненциально растущей культуре*. Эти две характеристики позволяют вычислить скорость роста как функцию размера клеток (рис. 9.10). Взаимоотношение этих величин сложное: очень мелкие клетки растут медленно, клетки промежуточного размера — быстрее, а у очень крупных клеток рост снова замедляется.

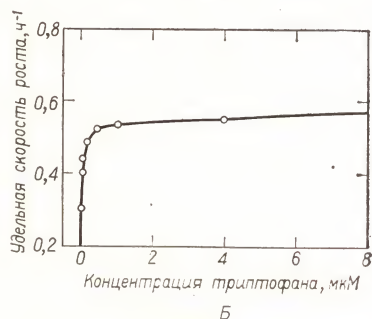
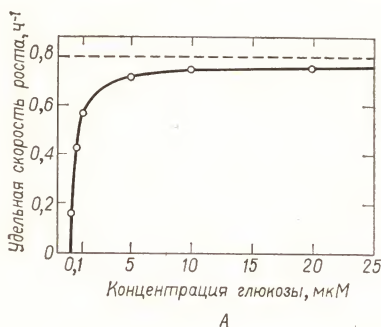
Аналогичные расчеты позволяют установить распределение клеток различного возраста (период, прошедший с момента деления, в результате которого они образовались) в экспоненциальной культуре (рис. 9.11). И в этом случае также наблюдается довольно сложное взаимоотношение, напоминающее связь между скоростью роста и размером клеток. Рис. 9.11 отражает общее свойство любой увеличивающейся популяции: численное преобладание молодых особей.

Пожалуй, наиболее наглядным примером того, что кинетику роста отдельных клеток нельзя вывести из кинетики роста общей популяции, является развитие *Caulobacter*. Популяция одноклеточных бактерий этого типа всегда состоит из двух морфологически различных видов клеток: клеток со стебель-

Рис. 9.12. Влияние концентрации питательного вещества на удельную скорость роста *E. coli*. А. Влияние concentra-

ции глюкозы. Б. Влияние концентрации триптофана (для мутанта, нуждающегося в триптофане). [Shehata T. E.,

Marr A. G., Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 107, 210 (1971).]



ками и клеток-швермеров. Стебельковые клетки всегда растут значительно быстрее, чем швермеры (см. гл. 5), хотя популяция в целом характеризуется экспоненциальным ростом с постоянной скоростью.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА СКОРОСТЬ РОСТА

Во многих отношениях процесс бактериального роста напоминает химическую реакцию, в которой из компонентов среды (реагентов) образуются новые клетки (продукты реакции), а бактериальная популяция играет роль катализатора. Скорость химической реакции определяется концентрацией реагентов, однако, как мы уже знаем, скорость роста бактерий остается постоянной до полного исчерпания в среде лимитирующего субстрата. Этот кажущийся парадокс объясняется действием пермеаз, которые способны поддерживать насыщающие внутриклеточные концентрации питательных веществ, хотя в среде эти вещества могут содержаться в самых различных концентрациях (гл. 10). Тем не менее при чрезвычайно низких концентрациях питательных веществ в окружающей среде пермеазные системы не в состоянии поддерживать насыщающие внутриклеточные концентрации этих веществ и скорость роста снижается.

Кривые, отражающие зависимость скорости роста от концентрации питательных веществ, представляют собой гиперболы (рис. 9.12) и описываются уравнением

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C}{K_s + C} \quad (9.12)$$

где μ — удельная скорость роста при концентрации лимитирующего субстрата (C), μ_{\max} — скорость роста при насы-

щающей концентрации субстрата и K_s — константа, аналогичная константе Михаэлиса—Ментен, применяемой в ферментативной кинетике и численно равная такой концентрации субстрата, которая обеспечивает скорость роста, соответствующую $\frac{1}{2} \mu_{\max}$. Значения K_s для потребления клетками *E. coli* глюкозы и триптофана составляют соответственно $1 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-7}$ М, или 0,18 и 0,03 мкг/мл. Такие низкие величины обусловлены высоким сродством к субстратам многих бактериальных пермеаз, которое можно рассматривать как эволюционное приспособление микроорганизмов к росту в чрезвычайной разбавленных растворах. В этом отношении общепринятые лабораторные среды сильно отличаются от большинства природных условий.

НЕПРЕРЫВНЫЕ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Культуры, которые мы рассматривали до сих пор, называются *периодическими культурами*; питательные вещества в них не возобновляются, и поэтому экспоненциальный рост клеток сохраняется только в течение нескольких генераций. Микробные популяции можно длительное время поддерживать в состоянии экспоненциального роста, используя систему непрерывного культивирования (рис. 9.13). При таком способе культивирования сосуд для выращивания (культиватор) присоединяют к резервуару со стерильной средой. В процессе роста клеток из резервуара в культиватор непрерывно поступает свежая среда. Объем жидкости в культиваторе поддерживается постоянным за счет непрерывного удаления ее избытка через сливной сифон.

Если свежая среда поступает с одинаковой скоростью, концентрация бактерий в культиваторе после начального периода регулировки остается постоянной. Иными словами, бактерии в культиваторе растут как раз с такой скоростью, которая достаточна для восполнения клеток, удаляемых через сифон. Если изменить скорость поступления свежей среды, то после очередного переходного периода создается популяция с новой постоянной плотностью; скорость роста изменяется в соответствии с новой скоростью потери клеток через сливное устройство. Таким образом, система непрерывного культивирования допускает широкое варьирование скорости добавления свежей среды. Однако независимо от скорости притока среды бактерии не могут расти быстрее, чем они росли бы в периодической культуре.

В связи с тем что в системе непрерывного культивирования плотность популяции сохраняется постоянной, возникает следующий вопрос: каким образом скорость добавления свежей среды в культиватор определяет скорость роста культуры? Объяснение основано на том, что скорость роста бактерий в аппарате для непрерывного культивирования всегда

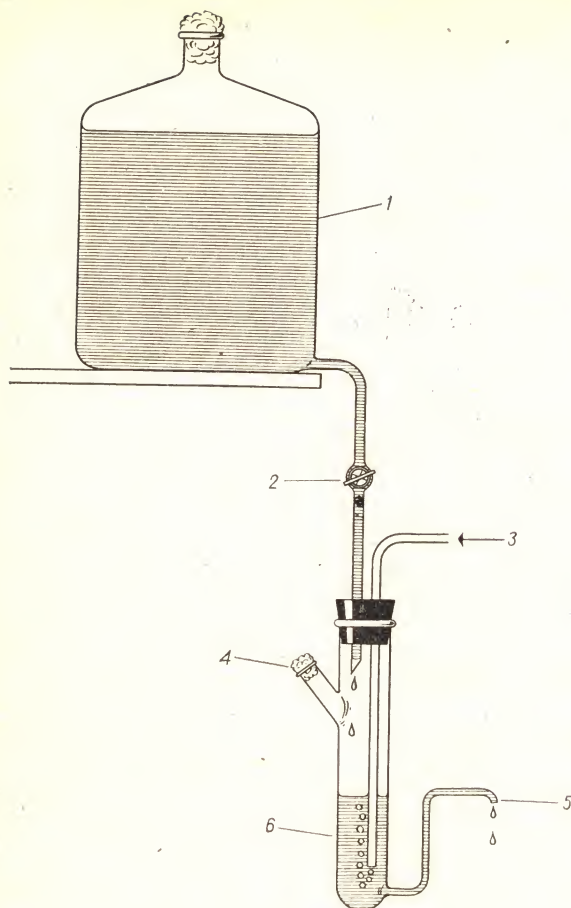


Рис. 9.13. Упрощенная схема системы непрерывного культивирования. 1 — резервуар со стерильной средой; 2 — кран для регулирования скорости потока жидкости; 3 — ввод воздуха для принудительной аэрации и перемешивания; 4 — отверстие для инокуляции и выхода воздуха; 5 — сливной сифон; 6 — культиватор.

ограничена концентрацией одного из питательных веществ. Следовательно, система является саморегулируемой: скорость добавления свежей среды определяет скорость роста культуры. Рассмотрим аппарат для непрерывного культивирования, который работает при постоянной скорости добавления свежей среды. После инокуляции культура сначала растет с максимальной скоростью (μ_{\max}). С повышением плотности клеток будет повышаться и скорость использования питательных веществ до тех пор, пока истощение одного из них не приведет к ограничению скорости роста. Пока скорость роста превышает скорость вымывания клеток через сливной сифон, их плотность продолжает увеличиваться, а равновесная концентрация лимитирующего субстрата в культиваторе продолжает снижаться. В результате скорость роста будет снижаться до тех пор, пока прирост клеток за счет размножения не станет в точности равным скорости их вымывания через сливное

устройство. Если бы скорость роста культуры на небольшой период стала ниже, чем скорость вымывания клеток, плотность суспензии уменьшилась бы, а концентрация лимитирующего субстрата увеличилась. Поэтому и скорость роста стала бы повышаться до ее уравнивания со скоростью вымывания клеток.

Используя тот факт, что в системе непрерывного культивирования плотность клеток сохраняется постоянной и саморегулируется, можно дать описание системы в математической форме:

$$\begin{aligned} & (\text{Скорость образования клеток за счет роста}) = \\ & = (\text{Скорость вымывания клеток через сливное устройство}). \end{aligned}$$

Ранее мы описывали скорость образования бактериальной массы (dX/dt) уравнением (9.2)

$$\frac{dX}{dt} = \mu X.$$

Скорость вымывания клеток через сливное устройство (dX/dt) может быть выражена как

$$\frac{dX}{dt} = \frac{f}{V} = DX, \quad (9.13)$$

где скорость потока (f) измерена в объеме культуры (V) за 1 ч. Выражение (f/VX) называется *скоростью разбавления* (D). Таким образом,

$$\mu X = DX \quad (9.14)$$

или

$$\mu = D, \quad (9.15)$$

что означает равенство скорости роста и скорости разбавления в стабилизированном аппарате проточного культивирования. Путем подстановки в уравнение (9.12) получаем

$$\mu_{\max} \frac{C}{K_s + C} = D, \quad (9.16)$$

а решая уравнение относительно C , имеем

$$C = K_s \frac{D}{\mu_{\max} - D}, \quad (9.17)$$

что выражает фундаментальную связь между концентрацией субстрата (C) в культиваторе и скоростью разбавления (D).

При равновесном состоянии концентрация лимитирующего субстрата C в аппарате непрерывного культивирования также сохраняется постоянной. Таким образом, скорость притока этого субстрата должна быть равна сумме скоростей его

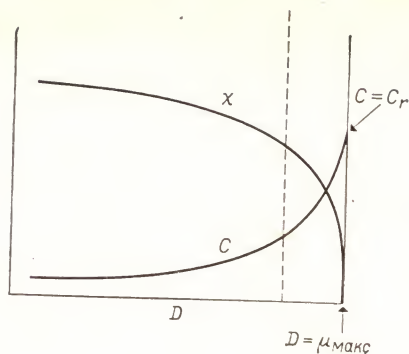


Рис. 9.14. Зависимость между плотностью клеточной суспензии (X), концентрацией лимитирующего субстрата (C) и скоростью разбавления (D) в системе непрерывного культивирования. Слева от пунктирной линии находится область работы хемостата, а справа — турбидостата.

использования культурой и вымывания через сливное устройство:

$$\begin{aligned} & (\text{Субстрат, добавленный из резервуара}) = \\ & = (\text{Субстрат, использованный для роста}) + \\ & + (\text{Субстрат, удаленный через сток}) \end{aligned} \quad (9.18)$$

или

$$DC_r = \frac{dc}{dt} + DC,$$

где C_r — концентрация лимитирующего субстрата в резервуаре, а dc/dt — скорость использования лимитирующего субстрата. Заменяя (dX/dt) (dc/dX) на dc/dt и зная, что $dX/dt = \mu X$, а $dc/dt = Y$, имеем

$$DC_r = \frac{\mu X}{Y} + DC. \quad (9.19)$$

В состоянии равновесия $D = \mu$, поэтому, решая уравнение относительно X , получаем

$$X = Y(C_r - C). \quad (9.20)$$

В этом уравнении выражена фундаментальная зависимость между плотностью клеток (X) и концентрацией лимитирующего субстрата (C) в культиваторе. Уравнения (9.17) и (9.20) позволяют представить взаимосвязь между плотностью клеток, концентрацией лимитирующего субстрата и скоростью разбавления (рис. 9.14). Плотность клеток и концентрация лимитирующего субстрата меняются незначительно при низких скоростях разбавления. Когда скорость разбавления приближается к μ_{\max} , плотность клеток быстро падает до нуля, а концентрация лимитирующего субстрата становится близкой к его концентрации в резервуаре (C_r).

ХЕМОСТАТЫ И ТУРБИДОСТАТЫ

Аппараты для непрерывного культивирования могут работать как *хемостаты* или как *турбидостаты*. В хемостате скорость потока жидкости устанавливается на определенном уровне, а скорость роста культуры приходит в соответствие со скоростью потока. В систему турбидостата входит светочувствительное устройство, измеряющее поглощение света культурой (плотность культуры) в культиваторе; электрический сигнал из этого устройства управляет скоростью потока. Таким образом, поглощение света культурой контролирует скорость потока жидкости, а скорость роста культуры устанавливается в соответствии со скоростью потока.

На практике хемостаты и турбидостаты обычно действуют при разных скоростях разбавления. В хемостате максимальная стабильность достигается в диапазоне таких скоростей разбавления, при которых плотность культуры лишь незначительно меняется с изменением скорости разбавления, т. е. при низких скоростях разбавления. Напротив, в турбидостате максимальная чувствительность и стабильность достигаются при высоких скоростях разбавления, т. е. в том диапазоне, в котором происходит быстрое изменение плотности культуры в зависимости от скорости разбавления (рис. 9.14).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Системы непрерывного культивирования обладают двумя особенностями, полезными при изучении микроорганизмов. Они обеспечивают стабильное получение клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста, а также дают возможность выращивать культуры при чрезвычайно низких концентрациях субстратов. Практические преимущества первой особенности очевидны. Выращивание микроорганизмов при низких концентрациях субстратов важно для изучения регуляции синтеза или катаболизма лимитирующего субстрата, для получения в результате селекции мутантов различных типов и для проведения экологических исследований.

ЭНЕРГИЯ, НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Как можно заметить на рис. 9.14, кривые, соответствующие плотности культуры и концентрации лимитирующего субстрата, не продолжены в область очень низких скоростей разбавления. Дело в том, что реакция культуры при очень низких скоростях разбавления зависит от природы лимитирующего субстрата. Если этот субстрат служит источником энергии, то при очень низких скоростях разбавления рост прекращается в связи с затратой некоторой части энергии на неростовые процессы. Эта энергия называется *энергией поддержания*

жизнедеятельности. Рост не может происходить, пока скорость притока источника энергии недостаточна для того, чтобы обеспечить большее количество энергии, чем то, которое необходимо для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов. Количество этой энергии может быть выражено в математической форме следующим образом:

$$\frac{dX}{dt} = \mu x - ax, \quad (9.21)$$

где a — константа удельной скорости затраты энергии на поддержание жизнедеятельности. Уравнение (9.21) представляет собой разновидность уравнения роста [уравнение (9.2)], применяемое в том случае, когда скорость роста ограничена притоком энергии. Поскольку обычно величина a невелика (например, для штамма *E. coli* ML30, растущего на среде с глюкозой, она равна $0,018 \text{ ч}^{-1}$), влияние энергии, необходимой для поддержания жизнедеятельности клеток, на скорость роста незначительно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Kubitschek H. E.*, 1970, Introduction to Research with Continuous Cultures, Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall.
Mandelstam J., McQuillen K., 1973, Biochemistry of Bacterial Growth, 2nd ed., New York, Wiley.
Meynell G. G., Meynell E., 1965, Theory and Practice in Experimental Bacteriology, Cambridge, England, University Press.

Обзоры

- Monod J.* (1949), The Growth of Bacterial Cultures, Ann. Rev. Microbiol., 3, 371.
Novick A. (1955), Growth of Bacteria, Ann. Rev. Microbiol., 9, 97.

10 ВЛИЯНИЕ ОКРУЖАЮЩИХ УСЛОВИЙ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

В этой главе будет рассмотрено взаимодействие микробной клетки с ее химическим и физическим окружением.

ФУНКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

Концентрация растворенных веществ внутри микробной клетки, как правило, превышает их концентрацию во внешней среде. Это справедливо как для природного окружения микроорганизмов, так и для большинства культуральных сред. К тому же растворенные вещества, находящиеся в клетке и в окружающей среде, качественно различны. Основным барьером, регулирующим переход растворенных веществ между клеткой и внешней средой, служит клеточная мембрана — структура постоянной толщины (приблизительно 10 нм), которая состоит из сложной смеси белков, липидов и гликопротеидов. Хотя молекулярная организация мембранных компонентов еще не выяснена, большое количество данных свидетельствует о том, что клеточная мембрана построена из двойного слоя фосфолипидов, в который включены различные белки (см. рис. 11.4).

Роль бактериальной мембраны в дыхательном метаболизме и в сегрегации хромосом обсуждалась в гл. 6 и 7. Здесь мы рассмотрим роль мембраны в сохранении определенного химического состава содержимого клетки.

У грамотрицательных бактерий внешний слой клеточной стенки (иногда называемый *внешней мембраной*, так как на поперечных срезах его тонкая структура напоминает структуру клеточной мембраны) также играет определенную, хотя и второстепенную, роль в регуляции распределения некоторых молекул между клеткой и внешней средой. Промежуток между клеточной мембраной и внешними слоями стенки грамотрицательных бактерий, называемый *периплазматическим пространством*, по химическому составу отличается и от содержимого клетки, и от внешней среды.

В этом отношении функции мембраны многообразны: она удерживает внутри клетки необходимые метаболиты и макромолекулы, «накачивает» в клетку определенные питательные вещества против градиента концентрации, позволяет свободно «вытекать» из клетки другим питательным веществам, а также препятствует проникновению в клетку некоторых растворенных веществ из окружающей среды.

Поскольку клеточная мембрана содержит двойной липидный слой, по чисто химическим соображениям она должна

полностью препятствовать проникновению всех полярных молекул. В действительности, однако, питательные вещества большей частью представляют собой полярные молекулы. Поэтому мембрана должна содержать определенные химически модифицированные участки, через которые проникают в клетку эти необходимые полярные молекулы; следовательно, такие участки функционируют в *мембранном транспорте*.

ПОСТУПЛЕНИЕ

ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКУ

Мембранный транспорт осуществляется посредством различных механизмов, простейший из которых — *пассивная диффузия*. Перемещение вещества путем пассивной диффузии происходит только за счет различия в его концентрации по обе стороны мембраны (градиента концентрации), причем в результате такого перемещения это различие исчезает. Скорость перемещения — прямая функция величины градиента, но она имеет предел даже при очень большом различии в концентрации вещества. Пассивная диффузия свидетельствует о существовании в мембране участков, через которые свободно проходят некоторые вещества, примерно так же, как небольшие молекулы проходят через искусственные мембраны, используемые для диализа. Вода — основное вещество, которое проникает в клетку и покидает ее путем пассивной диффузии.

ОБЛЕГЧЕННАЯ ДИФфуЗИЯ

Пассивная диффузия обнаруживает лишь минимальную субстратную специфичность. Например, энантиоморфные формы оптически активных соединений не различаются по способности к пассивной диффузии. Сходный транспортный механизм, называемый *облегченной диффузией*, обнаруживает специфичность, характерную для реакций, катализируемых ферментами. Облегченная диффузия протекает при участии особых мембранных белков, которые в ряде случаев индуцируются своими субстратами. Эти мембранные белки в совокупности называют *пермеазами*, они связывают молекулу субстрата на внешней стороне мембраны и делают возможным ее проникновение через мембрану посредством механизмов, во многом еще не известных. Диссоциация комплекса на внутренней поверхности мембраны завершает процесс транспорта. Простейшая интерпретация функции пермеаз заключается в том, что они способны проходить через мембранный барьер как с присоединенной молекулой субстрата, так и без нее. Таким образом, они катализируют общую реакцию.

Субстрат (вне клетки) \longleftrightarrow Субстрат (внутри клетки).

62 Облегченная диффузия аналогична простой диффузии в том отношении, что субстрат движется по градиенту кон-

центрации в термодинамически благоприятном направлении, т. е. от более высокой к более низкой концентрации. Поэтому *данный процесс не требует затраты метаболической энергии*. Он отличается от пассивной диффузии тем, что протекает при участии специфических белковых катализаторов, во многих отношениях сходных с ферментами. Процесс идет с высокой скоростью (более высокой, чем скорость, обеспечиваемая пассивной диффузией) и обнаруживает значительную субстратную специфичность. Катализаторы облегченной диффузии часто являются индуцибельными. Наконец, при возрастании концентрации субстрата скорость реакции достигает предела, т. е. она подчиняется обычной ферментативной кинетике (Михаэлиса — Ментен). Скорость поступления субстрата внутрь клетки может быть описана уравнением

$$V_{\text{вход}} = V_{\text{тах}}^{\text{вход}} \frac{[S]_{\text{сн}}}{K_{\text{М}}^{\text{вход}} + [S]_{\text{сн}}}, \quad (10.1)$$

а скорость выхода уравнением

$$V_{\text{выход}} = V_{\text{тах}}^{\text{выход}} \frac{[S]_{\text{вн}}}{K_{\text{М}}^{\text{выход}} + [S]_{\text{вн}}}, \quad (10.2)$$

где $[S]_{\text{сн}}$ и $[S]_{\text{вн}}$ — концентрации субстрата, находящегося снаружи и внутри клетки соответственно, а $V_{\text{тах}}^{\text{вход}}$ и $V_{\text{тах}}^{\text{выход}}$ — скорости входа и выхода при насыщающих концентрациях субстрата; $K_{\text{М}}^{\text{вход}}$ и $K_{\text{М}}^{\text{выход}}$ — константы Михаэлиса (обратно пропорциональные сродству пермеазы к ее субстратам) для процессов входа и выхода. При облегченной диффузии значения $V_{\text{тах}}$ для реакций входа и выхода равны между собой, так же как и величины $K_{\text{М}}^{\text{вход}}$ и $K_{\text{М}}^{\text{выход}}$. Следовательно, *в состоянии равновесия внутренняя и внешняя концентрации субстрата, транспортируемого посредством облегченной диффузии, равны*.

Хотя у эукариот облегченная диффузия — обычный механизм транспорта, она относительно редко встречается у прокариот. Например, для сахаров характерно проникновение в клетки эукариот посредством облегченной диффузии, тогда как в клетки прокариот они поступают за счет механизмов другого типа, а именно активного транспорта, который рассматривается ниже. У прокариот единственным транспортным процессом, осуществляемым путем облегченной диффузии, является проникновение глицерина в клетки бактерий кишечной группы.

АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

Механизмы транспорта, называемые в совокупности *активным транспортом*, позволяют растворенным веществам поступать в клетку против термодинамически неблагоприятного градиента концентрации. Системы активного транспорта

создают внутри клетки концентрации растворенных веществ, которые в состоянии равновесия могут в несколько тысяч раз превышать их концентрации во внешней среде. Преобладание у бактерий механизмов активного транспорта может быть связано с тем обстоятельством, что эти микроорганизмы часто заселяют среды с низкой концентрацией химических веществ и тем не менее обнаруживают высокие скорости метаболизма. Поскольку активный транспорт приводит к концентрированию растворенных веществ внутри клетки против термодинамически неблагоприятного градиента, он требует затраты метаболической энергии. Механизм сопряжения метаболической энергии с активным транспортом остается одним из наиболее интересных и важных вопросов биологии клетки.

В качестве одного из многочисленных примеров бактериальных систем активного транспорта рассмотрим систему концентрирования дисахарида лактозы в клетках *E. coli*. Эта система называется β -галактозидпермеазной системой. Транспорт β -галактозидов идет при участии специфической пермеазы, причем этот процесс сопряжен с затратой метаболической энергии. Метаболическая энергия используется для снижения сродства пермеазы к лактозе (или другим β -галактозидам) на внутренней стороне мембраны по сравнению с ее сродством к тем же субстратам на внешней стороне мембраны. В результате $K_M^{\text{выход}}$ становится больше, чем $K_M^{\text{вход}}$, а скорость выхода веществ наружу — меньше, чем скорость их поступления внутрь клетки [уравнения (10.1) и (10.2)]. Поэтому в состоянии равновесия $[S]_{\text{вн}}$ больше, чем $[S]_{\text{сн}}$. Если образование энергии блокировать добавлением к клеткам метаболических ядов, например азиды натрия, β -галактозидпермеазная система теряет способность осуществлять активный транспорт. При этих условиях пермеазная система катализирует облегченную диффузию β -галактозидов, обнаруживая одинаковое сродство к ним по обе стороны мембраны. Скорость проникновения β -галактозидов внутрь клетки становится равной скорости их выхода наружу.

β -Галактозидпермеаза (иногда называемая *M*-белком) выделена из клеточной мембраны путем обработки последней детергентами. Она кодируется специальным геном — *lac Y*. Некоторые мутации этого локуса лишают клетку способности транспортировать лактозу, а следовательно, и метаболизировать ее, хотя внутри клетки присутствуют все ферменты, необходимые для метаболизма лактозы. Такие мутанты называют *криптическими*. Криптичность, вызываемая отсутствием специфической транспортной системы, — довольно обычное явление у организмов дикого типа¹. Например, неспособность штаммов дикого типа *E. coli* использовать цитрат в качестве

¹ Генетический штамм любого организма, впервые выделенный из природного источника, называют штаммом дикого типа.

источника углерода [свойство, существенное для классификации энтеробактерий (гл. 21)] является результатом криптичности, поскольку в клетках *E. coli* присутствуют ферменты, необходимые для диссимиляции цитрата, являющегося ключевым интермедиатом дыхательного метаболизма.

СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

У грамотрицательных бактерий многие системы активного транспорта включают так называемые *связывающие белки*, локализованные в периплазматическом пространстве. Они могут быть освобождены из клеток путем резкого снижения осмотического давления в окружающей среде при низкой температуре. Такая обработка, называемая *холодовым осмотическим шоком*, повреждает внешний слой клеточной стенки и вследствие этого позволяет белкам периплазмы выходить в окружающую среду. К таким белкам относятся и связывающие белки, обладающие очень высоким сродством к определенным питательным веществам. Константы диссоциации для них лежат в пределах от 10^{-7} до 10^{-9} . Выделено и изучено свыше 100 различных связывающих белков. У них отсутствует каталитическая активность, однако они образуют прочные комплексы с определенными питательными веществами, включая аминокислоты, сахара и неорганические ионы. Показано, что связывающие белки необходимы для активного транспорта их субстратов, так как мутанты, потерявшие способность синтезировать специфический связывающий белок, одновременно утрачивают способность накапливать его субстрат. Однако эти белки не идентичны пермеазам, поскольку они не включены в структуру клеточной мембраны, а являются водорастворимыми белками периплазматического пространства. Хотя необходимость их участия в транспорте показана как генетическими, так и биохимическими методами, они функционируют только в комбинации со специфическими пермеазами, локализованными в клеточной мембране. Потеря в результате мутации как специфического связывающего белка, так и специфической пермеазы, определяющей проникновение данного питательного вещества в клетку, приводит к криптичности по этому субстрату.

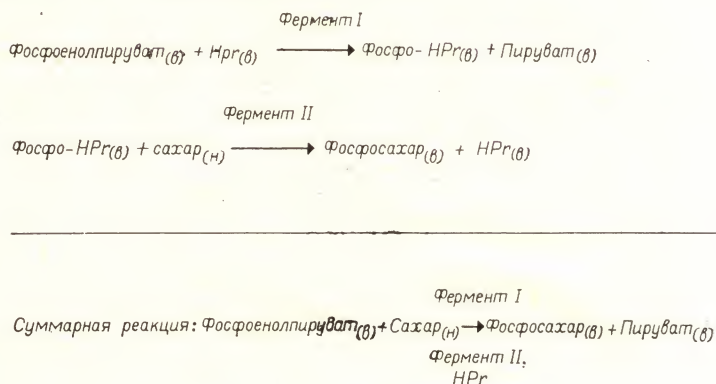
ПЕРЕНОС РАДИКАЛОВ

В процессе активного транспорта происходит перемещение через клеточную мембрану химически не измененных питательных веществ против градиента концентрации. У бактерий есть и другие транспортные системы, которые переводят питательное вещество в химически измененную форму, не способную проходить через мембрану. Подобные системы переноса радикалов не осуществляют активный транспорт, так как концентрация неизмененного питательного вещества внутри клетки $[S]_{\text{вн}}$ всегда остается очень низкой. Однако в целом процесс

Рис. 10.1. Реакции фосфотрансферазной системы. Белок НРг и фермент I — растворимые внутриклеточные белки, участвующие в образовании фосфо-НРг, который служит донором фосфорильной группы для ряда транспортных си-

стем сахаров. Каждая из этих систем катализируется специфическим ферментом II, локализованным в клеточной мембране. Суммарная реакция, катализируемая этими тремя белками, представляет собой фосфорилирование сахара за счет

фосфоенолпирувата с одновременным переносом сахарного остатка через мембрану. Подстрочные индексы указывают на локализацию соединения с наружной (н) или внутренней (в) стороны клеточной мембраны.



переноса радикалов напоминает активный транспорт, поскольку концентрация химически измененного соединения внутри клетки может значительно превышать концентрацию свободного соединения в среде.

Примером системы переноса радикалов, широко распространенной среди бактерий, является *фосфотрансферазная система*. Она транспортирует многие сахара и их производные, которые фосфорилируются в процессе транспорта и поступают в клетку в виде сахарофосфатов. Так как мембрана практически непроницаема для большинства фосфорилированных соединений, образовавшиеся сахарофосфаты задерживаются внутри клетки.

Два растворимых белка, фермент I и НРг — неспецифические компоненты этой системы. Фермент I катализирует перенос богатой энергией фосфатной группы от фосфоенолпирувиноградной кислоты на гистидиновый остаток белка НРг. Фосфо-НРг служит общим донором фосфорильной группы для всех субстратов, транспортируемых фосфотрансферазной системой. Фосфорилирование этих субстратов катализируется набором субстрат-специфичных белков, связанных с мембраной, которые носят общее название — ферменты II. Следовательно, суммарной химической реакцией, сопровождающей транспорт, является фосфорилирование субстрата за счет богатой энергией фосфатной группы фосфоенолпирувиноградной кислоты (рис. 10.1).

Пурин или Пиримидин (снаружи) + Фосфорибозилпирофосфат

Фосфорибозилтрансфераза

→ Пурин-или Пиримидинмононуклеотид (внутри) + Пирофосфат

Рис. 10.2. Реакции, участвующие в переносе пуриновых и пиримидиновых оснований через клеточную мембрану.

Каждый вид бактерий содержит по одной молекулярной форме фермента I и белка НРг, которые участвуют в транспорте многих сахаров. Мутантные штаммы, не способные синтезировать фермент I или белок НРг, утрачивают способность транспортировать (а следовательно, и использовать) многие сахара. Например, мутанты *Salmonella typhimurium*, у которых отсутствует фермент I, не способны утилизировать глюкозу, маннозу, фруктозу, глицерин, маннит, сорбит, N-ацетилглюкозамин, мальтозу и мелибиозу. Мутанты, утратившие какой-либо один специфический фермент II, теряют способность использовать только один сахар.

По-видимому, связанные с мембраной ферменты II не только выступают в роли фосфотрансфераз благодаря их специфической каталитической активности, но и выполняют функции пермеаз. У мутантных штаммов, утративших фермент I или белок НРг, ферменты II катализируют облегченную диффузию своих специфических субстратов.

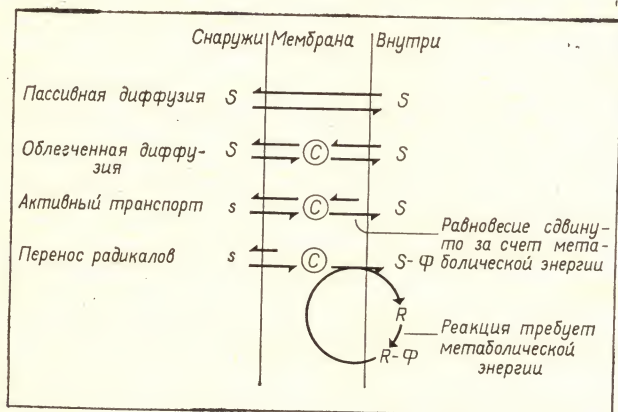
У бактерий кишечной группы большинство используемых сахаров, за исключением β-галактозидов и пентоз, транспортируется фосфотрансферазной системой.

Определение энергетических потребностей β-галактозид-пермеазной системы приводит к выводу, что на одну молекулу транспортируемой лактозы расходуется энергия, эквивалентная одной молекуле АТФ. Транспорт сахара с помощью фосфотрансферазной системы также требует затраты богатой энергией фосфатной связи (в данном случае высокоэнергетической связи фосфоенолпирувата, получаемой в конечном счете из АТФ). Однако продуктом реакции переноса в этой системе является фосфорилированное производное сахара. Следовательно, при этом осуществляется первая реакция катаболизма молекулы свободного сахара — фосфорилирование киназой за счет АТФ. Поэтому по сравнению с активным транспортом транспорт сахаров с помощью фосфотрансферазной системы связан с меньшими затратами АТФ. Это особенно важно при сбраживании сахаров, когда суммарный выход АТФ на 1 моль использованного субстрата невелик. Именно это обстоятельство объясняет особое значение фосфотрансферазной системы в транспорте сахаров у бактерий, для которых характерным типом обмена углеводов является брожение. Таким образом, эта система неизменно функционирует у факультативно аэробных энтеробактерий, но отсутствует

Рис. 10.3. Сравнение бактериальных транспортных систем. Разная длина стрелок указывает на сдвиг равновесия реакции в сторону более длинной стрелки. S

и s означают соответственно высокую и низкую концентрации растворенных веществ. C — белок-переносчик (пермеаза). Схема переноса радикалов основана на свойст-

вах фосфотрансферазной системы; R, R-Ф и Ф означают белок НРг, фосфо-НРг и фосфорильную группу соответственно.



у некоторых групп бактерий с чисто дыхательным типом метаболизма углеводов, таких, как аэробные псевдомонады, у которых активный транспорт является преобладающим механизмом, осуществляющим поступление сахаров в клетку.

У энтеробактерий поглощение пуриновых и пиримидиновых оснований также происходит с участием механизма переноса радикалов. По-видимому, процессы транспорта и образования нуклеотидов неразрывно связаны между собой (рис. 10.2).

КРАТКОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО МЕХАНИЗМОВ МЕМБРАННОГО ТРАНСПОРТА

Различные транспортные системы, функционирующие у бактерий, схематически изображены на рис. 10.3. Простая диффузия представляет собой суммарное перемещение вещества через толщу мембраны, не являющейся барьером для его проникновения, в направлении термодинамически благоприятного градиента концентрации этого вещества. Облегченная диффузия происходит при участии специфических белковых переносчиков, или пермеаз (C), катализирующих перемещение вещества через мембрану в направлении термодинамически благоприятного градиента. Такое вещество не способно проникать через мембрану путем простой диффузии. В случае активного транспорта, как и при облегченной диффузии, перемещение вещества через мембрану осуществляется специфической пермеазой (C), но это перемещение может проис-

ходить против градиента концентрации благодаря одновременному расходу метаболически доступной энергии. В переносе радикалов также участвуют специфические пермеазы, однако этот процесс сопровождается химической модификацией транспортируемого соединения.

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НА РОСТ И МЕТАБОЛИЗМ

В процессе функционирования клетки транспортные механизмы выполняют две главные задачи. Во-первых, они поддерживают на достаточно высоком уровне внутриклеточные концентрации всех важнейших субстратов, обеспечивая работу как катаболических, так и анаболических путей со скоростями, близкими к максимальным, даже при низких концентрациях исходных субстратов во внешней среде. Это подтверждается тем, что скорости экспоненциального роста микробных популяций сохраняются постоянными до тех пор, пока количество одного из необходимых питательных веществ не снизится до почти полного его исчерпания. При этой концентрации лимитирующего питательного вещества скорость роста популяции быстро падает до нуля (см. гл. 9). Во-вторых, активный транспорт выполняет функцию *осморегуляции*, поддерживая в клетках оптимальный для метаболической активности уровень растворенных веществ (главным образом небольших молекул и ионов), даже если осмолярность окружающей среды изменяется в относительно широких пределах¹.

¹ Если *раствор* какого-либо вещества отделить, от *чистого растворителя* мембраной, проницаемой для молекул растворителя, но не для молекул растворенного вещества, то растворитель будет стремиться проникнуть через мембрану в раствор и разбавить его. Движение растворителя через мембрану может быть предотвращено, если к раствору приложить некоторое гидростатическое давление. Это давление называется *осмотическим давлением*. Разность осмотических давлений существует также между двумя растворами, содержащими разные концентрации одного и того же растворенного вещества.

Осмотическое давление какого-либо раствора может быть выражено в единицах *осмолярности*. Осмолярным раствором называется раствор, содержащий один *осмоль* вещества в 1 л растворителя, т. е. одномолярный раствор идеального неэлектролита. Осмотическое давление осмолярного раствора равно 22,4 атм при 0°C, а температура замерзания растворителя (воды) в нем снижена на 1,86°C. Если растворенное вещество—электролит, его осмолярность зависит от степени диссоциации, так как и ионы и недиссоциированные молекулы вносят вклад в осмолярность. Следовательно, осмолярность и молярность раствора электролита сильно различаются. Если известны и молярность и константа диссоциации растворенного электролита, то можно с некоторой степенью приближения вычислить его осмолярность как сумму молей недиссоциированного вещества и мольных эквивалентов ионов. Такой расчет является точным только для предельно разбавленного идеального раствора. Поэтому предпочтительнее определять осмолярность раствора экспериментально, например по снижению температуры замерзания.

Большинство бактерий не нуждается в точной регуляции их внутриклеточной осмолярности, поскольку они покрыты клеточной стенкой, способной противостоять значительному осмотическому давлению. Бактерии всегда поддерживают свою осмолярность на значительно более высоком уровне, чем осмолярность среды. Если внутриклеточное осмотическое давление падает ниже внешнего, вода покидает клетку и объем цитоплазмы уменьшается, что сопровождается повреждением мембраны. У грамположительных бактерий это приводит к тому, что мембрана отстает от клеточной стенки, и в этом случае говорят, что произошел *плазмолиз*. Грамотрицательные бактерии не подвергаются плазмолизу, так как их стенка отстает от содержимого клетки вместе с мембраной, что также вызывает повреждение мембраны.

Бактерии сильно различаются по их осмотическим потребностям. Одни из них могут расти в очень разбавленных растворах, а другие — в насыщенных растворах хлористого натрия. Микроорганизмы, способные существовать в растворах с высокой осмолярностью, называют *осмофилами*. Большинство природных сред с высокой осмолярностью содержит высокие концентрации солей, особенно хлористого натрия. Микроорганизмы, которые растут в таких средах, называются *галофилами*. Бактерии можно разделить на четыре основные категории на основе их устойчивости к солям: *негалофилы*, *морские организмы*, *умеренные галофилы* и *крайние галофилы* (табл. 10.1). Некоторые галофилы, например *Pediococcus halophilus*, могут переносить высокие концентрации солей в

ТАБЛИЦА 10.1
ОСМОТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИЙ¹

Физиологический класс	Представители	Приблизительный интервал концентраций NaCl, не препятствующих росту, % (вес/объем)
Негалофильные организмы	<i>Spirillum serpens</i>	0,0—1
	<i>Escherichia coli</i>	0,0—4
Морские формы	<i>Alteromonas haloplanktis</i>	0,2—5
	<i>Pseudomonas marina</i>	0,1—5
Умеренные галофилы	<i>Micrococcus halodenitrificans</i>	2,3—20,5
	<i>Vibrio costicolus</i>	2,3—20,5
	<i>Pediococcus halophilus</i>	0,0—20
Крайние галофилы	<i>Halobacterium salinarium</i>	12—36 (насыщенный раствор)
	<i>Sarcina morrhuae</i>	5—36 (насыщенный раствор)

¹ Даны лишь приблизительные интервалы переносимых концентраций соли; они варьируют в зависимости от штамма и наличия в среде других ионов.

питательной среде, но могут также развиваться и в средах, не содержащих NaCl. Другие бактерии, в том числе морские организмы и некоторые умеренные галофилы, а также крайние галофилы, нуждаются для роста в NaCl. Способность переносить среды с высокой осмолярностью и специфическая потребность в NaCl — явления различные, и каждое имеет свою биохимическую основу.

ОСМОТОЛЕРАНТНОСТЬ

Осмолерантность — способность организма развиваться в средах с широко варьирующей осмолярностью — обеспечивается у бактерий благодаря тому, что внутриклеточная осмолярность устанавливается таким образом, что она всегда превышает осмолярность среды. Главную роль в такой регуляции играет, по-видимому, накопление внутри клетки ионов калия (K^+). Показано, что многие бактерии концентрируют K^+ в значительно большей степени, чем Na^+ (табл. 10.2). Кроме того, существует четкая корреляция между осмолерантностью бактерий и содержанием в них K^+ . Для таких различных по метаболизму бактерий, как грамположительные кокки и бациллы и грамотрицательные палочки, относительная осмолерантность может быть определена на основании относительного содержания в них K^+ после выращивания на среде с постоянной ионной силой и составом. Изучение *E. coli* показало, что внутриклеточная концентрация K^+ постепенно возрастает по мере увеличения осмолярности ростовой среды. Следовательно, в клетках увеличиваются и осмолярность, и ионная сила¹.

Поддержание внутри клетки относительно постоянной ионной силы крайне важно в физиологическом отношении, так как стабильность и режим работы ферментов и других биологических макромолекул сильно зависят от этого фактора. В обеспечении относительного постоянства внутриклеточной ионной силы у бактерий, по-видимому, важную роль играет такой диамин, как путресцин (см. гл. 7, стр. 282). Это показано исследованиями, проведенными на *E. coli*. Концентрация внутриклеточного путресцина изменяется обратно пропорционально осмолярности среды; увеличение осмолярности вызывает быстрое выделение путресцина в среду. При повышении осмолярности среды внутриклеточная осмолярность возрастает в результате поглощения клеткой K^+ , а ионная сила сохраняется в ней почти постоянной за счет выделения путресцина. Это является следствием различного вклада многоза-

¹ Ионная сила раствора определяется по уравнению $I = \frac{1}{2} \sum M_i Z^2$, где M_i — молярность данного иона, а Z — его заряд независимо от знака. Так как величина Z возводится в квадрат, ионная сила экспоненциально возрастает с увеличением заряда иона, как положительного, так и отрицательного. Однако величина заряда иона не влияет на осмолярность.

ТАБЛИЦА 10.2
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ
У РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИЙ¹

Организм	Концентрация в ростовой среде, ‰ (вес/объем)		Отношение внутри- клеточной и вне- клеточной кон- центраций	
	NaCl	KCl	Na ⁺	K ⁺
Негалофильные организмы				
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,9	0,19	0,7	27
<i>Salmonella oranienburg</i>	0,9	0,19	0,9	10
Умеренные галофилы				
<i>Micrococcus halodenitrificans</i>	5,9	0,02	0,3	120
<i>Vibrio costicolus</i>	5,9	0,02	0,7	55
Крайние галофилы				
<i>Sarcina morrhuae</i>	23,4	0,24	0,8	64
<i>Halobacterium salinarium</i>	23,4	0,24	0,3	140

¹ Данные взяты из работы: Christian J. H. B., Waltho J. A., Solute concentrations within cells of halophilic and nonhalophilic bacteria, Biochem. Biophys. Acta, 65, 506 (1962).

рядного иона в ионную силу и в осмотическое давление раствора; сдвиг концентрации путресцина²⁺, который меняет ионную силу на 58%, вызывает изменение осмотического давления только на 14%.

ПОТРЕБНОСТЬ БАКТЕРИЙ В Na⁺

У большинства негалофильных бактерий не удастся обнаружить специфической потребности в Na⁺. Учитывая значительные экспериментальные трудности, связанные с приготовлением среды, полностью освобожденной от этого весьма распространенного иона, нельзя исключить возможность, что негалофильные организмы нуждаются в очень низкой концентрации Na⁺. Потребность в Na⁺ у негалофилов обнаруживается только в том случае, когда они выращиваются в присутствии специфических источников углерода и энергии: например, *E. coli* нуждается в Na⁺ для роста с максимальной скоростью на среде с L-глутаматом, а *Enterobacter aerogenes* — на среде с цитратом. В обоих случаях количественная потребность невелика, а абсолютная зависимость от Na⁺ не выявлена.

Напротив, бактерии морского происхождения, умеренные и крайние галофилы, всегда нуждаются в таких высоких концентрациях Na⁺, что их абсолютная зависимость от этого катиона может быть легко доказана экспериментально, для этого даже нет необходимости готовить основную среду из специально очищенных (свободных от Na⁺) компонентов.

У всех этих организмов Na⁺, по-видимому, выполняет ряд различных функций, необходимых для поддержания жизнедеятельности клетки. Существуют убедительные доказатель-

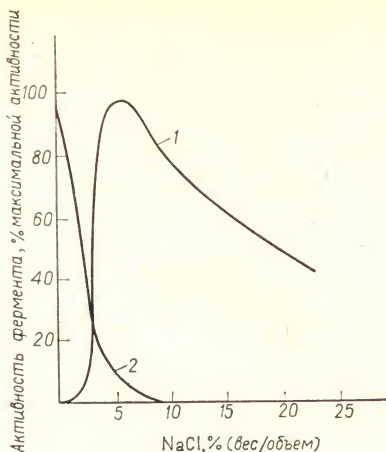


Рис. 10.4. Влияние NaCl на активность малатдегидрогеназы, выделенной из крайнего галофила (1) и из печени (2). Подобно большинству других ферментов, фермент из печени инактивируется при высоких концентрациях NaCl. Фермент крайнего галофила требует присутствия NaCl для сохранения активности. [Larsen H., *Biochemical aspects of extreme halophilism*, *Advan. Microbiol. Physiol.*, 1, 97 (1967).]

ства, что у морских бактерий он обеспечивает нормальное функционирование транспортных механизмов. У крайних галофилов высокая концентрация NaCl необходима для поддержания стабильности и каталитической активности ферментов (рис. 10.4).

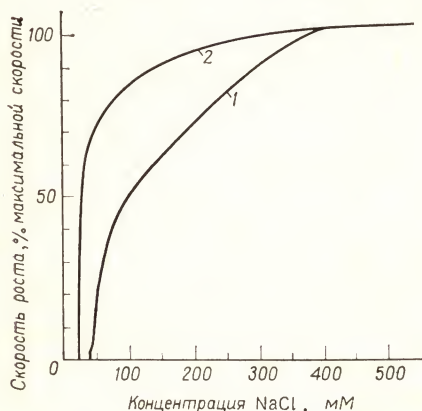
В клеточной стенке крайних галофилов рода *Halobacterium* отсутствует слой пептидогликана, и она состоит целиком из белка. Тем не менее в очень концентрированных солевых растворах (25—35%, вес/объем), сходных с природными средами, в которых живут эти организмы, белковая стенка обладает достаточной жесткостью, чтобы придать клетке цилиндрическую форму. Если окружающую среду разбавить приблизительно до 15%-ной концентрации соли (вес/объем), то клетки становятся круглыми, но не лизируются. При более низкой концентрации наступает лизис и стенка распадается на белковые мономеры. Таким образом, клеточная стенка *Halobacterium* уникальна в том отношении, что ее структурная целостность обеспечивается ионными связями, причем для сохранения межмолекулярной ассоциации белковых субъединиц стенки необходима очень высокая концентрация Na^+ , который практически невозможно заменить другими одновалентными катионами.

Для морских бактерий и других галофилов величина потребности в Na^+ может быть существенно снижена (приблизительно в два раза) путем увеличения концентрации в среде двухвалентных катионов: Mg^{2+} и Ca^{2+} . В количественном отношении потребности многих галофилов в Mg^{2+} и Ca^{2+} также, по-видимому, значительно выше, чем потребности негалофилов. На рис. 10.5 показано влияние содержания NaCl в двух различных средах на рост типичного представителя морских бактерий.

Рис. 10.5. Влияние концентрации NaCl на скорость роста типичной морской бактерии *Pseudomonas marina*, растущей (1) в среде, содержащей обычные для наземных условий концентрации Mg^{2+} и Ca^{2+} (2 мМ $MgSO_4$ и 0,55 мМ

$CaCl_2$), и (2) в среде с концентрациями этих ионов (50 мМ $MgSO_4$ и 10 мМ $CaCl_2$), характерными для морских условий; в других отношениях среды одинаковы. Видно, что более высокие концентрации Mg^{2+} и Ca^{2+} , характер-

ные для морских условий, снижают потребность в NaCl. [Reichelt J. L., Baumann P., Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria, Arch. Microbiol., 97, 239 (1974).]



ОБРАЗОВАНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Эукариотические клетки, у которых нет стенки, могут поглощать частицы вещества и капли жидкости из окружающей среды с помощью фагоцитоза или пиноцитоза. Бактерии, так же как и эукариотические микроорганизмы, у которых есть стенка, не могут осуществлять эти процессы. Тем не менее они способны использовать в качестве питательных веществ самые различные макромолекулы, включая полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Большая часть этих макромолекул не может проходить через мембрану¹ и подвергается деградации вне клетки с помощью *экзоферментов*, синтезируемых внутри клетки и выделяемых в среду. Экзоферменты являются гидролазами. Большинство из них катализирует гидролиз макромолекулярных субстратов до растворимых конечных продуктов (обычно димеров или мономеров), которые поступают в клетку с помощью специфических транспортных механизмов и служат источниками углерода и энергии. Первичный гидролиз макромолекул называют *внеклеточным перевариванием*, чтобы отличить его от *внутриклеточного переваривания*, сопровождающего фагоцитоз и пиноцитоз

¹ Особым исключением из этого правила является поглощение высокомолекулярной ДНК бактериями, способными к трансформации (гл. 15).

у эукариот. Когда колония микроорганизма развивается на агаризованной среде, содержащей частицы нерастворимых макромолекулярных субстратов, подвергающихся перевариванию, каждая колония бывает окружена расширяющейся светлой зоной, в которой находится гидролизованный экзоферментами субстрат. В табл. 10.3 перечислены некоторые субстраты и образующиеся под действием микробных экзоферментов продукты.

ТАБЛИЦА 10.3

НЕКОТОРЫЕ ЭКЗОФЕРМЕНТЫ И ОБРАЗУЮЩИЕ ИХ ОРГАНИЗМЫ

Экзофермент	Макромолекулярный субстрат	Молекулы, проникающие в клетку	Микроорганизмы-продуценты
<i>Ферменты, расщепляющие полисахариды</i>			
Амилаза	Крахмал	Глюкоза, мальтоза, олигоглюкозиды	<i>Bacillus subtilis</i>
Пектиназа	Пектин	Галактуроновая кислота	<i>Bacillus polymyxa</i>
Целлюлаза	Целлюлоза	Глюкоза, целлобиоза	<i>Clostridium thermocellum</i>
Лизоцим	Пептидогликаны		<i>Staphylococcus aureus</i>
Хитиназа	Хитин	Хитобиоза	
<i>Протеиназы</i>			
Пептидаза	Пептиды	Аминокислоты	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Нуклеазы</i>			
Дезоксирибонуклеаза	ДНК	Дезоксирибонуклеозиды ¹	<i>Streptococcus haemolyticus</i>
Рибонуклеаза	РНК	Рибонуклеозиды	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Эстеразы</i>			
Липазы	Липиды	Глицерин, жирные кислоты	<i>Clostridium welchii</i>
Поли-β-оксибутиратдеполимераза	Поли-β-оксибутират	β-Оксибутирил-β-оксибутират	<i>Pseudomonas</i> spp.

¹ Хотя первичными продуктами гидролиза являются нуклеотиды, перед проникновением в клетку они гидролизуются до нуклеозидов.

Большинство экзоферментов, выполняющих функцию переваривания субстратов, подвергается катаболитной репрессии. Следовательно, их синтез подавляется, если в окружающей

среде присутствуют источники углерода и энергии, которые метаболизируются быстрее, чем субстраты этих ферментов. Кроме того, многие экзоферменты индуцибельны. Так как макромолекулярные субстраты не могут проникать в клетку, синтез фермента должен запускаться с помощью других индукторов. Этими индукторами являются, по-видимому, растворимые продукты гидролиза, способные проникать в клетку. Экзоферменты синтезируются, хотя и с низкой скоростью, даже при отсутствии специфического субстрата, поэтому наличие субстрата в среде всегда приводит к образованию продуктов гидролиза, которые, вероятно, и вызывают индукцию.

Не всегда роль экзоферментов заключается в обеспечении клетки доступными источниками углерода и энергии. Так, например, 5'-нуклеотидазы превращают нуклеотиды, для которых мембрана непроницаема, в нуклеозиды, способные проникать в клетку, где они прямо используются для биосинтеза. Некоторые ферменты, разрушающие антибиотики, также являются экзоферментами, например пенициллиназы многих бактерий, которые гидролизуют четырехчленное β -лактамное кольцо пенициллинов и тем самым обезвреживают их. Благодаря внеклеточной локализации этого фермента образующий его организм, несомненно, получает преимущество при отборе.

ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

В периплазматическом пространстве (промежутке между клеточной мембраной и стенкой) у грамотрицательных бактерий находятся так называемые периплазматические ферменты. Они, очевидно, являются экзоферментами, так как расположены снаружи от клеточной мембраны. Однако эти ферменты не могут проходить через внешний слой клеточной стенки и «заперты» в периплазме. Об их локализации судят обычно на том основании, что они освобождаются при химической или физической обработке клеток, повреждающей внешний слой стенки, но не приводящей к освобождению цитоплазматических белков. Эти воздействия включают ферментативное удаление стенки (путем обработки лизоцимом в присутствии хелатообразующего агента — ЭДТА) и холодовой осмотический шок (быстрое суспендирование плазмолизованных клеток в разбавленной среде при низкой температуре). Относительно небольшое число ферментов, найденных в периплазме грамотрицательных бактерий, выполняет функцию расщепления субстратов (табл. 10.4). Большая часть этих ферментов — фосфатазы, превращающие фосфорилированные соединения, для которых мембрана непроницаема, в нефосфорилированные производные (ферменты с 3-го по 7-й в табл. 10.4). К ним принадлежат также пенициллиназы.

Интересно, что многие из ферментов, которые у грамотрицательных бактерий находятся в периплазме, являются истин-

ТАБЛИЦА 10.4

НЕКОТОРЫЕ ФЕРМЕНТЫ, ЛОКАЛИЗОВАННЫЕ В ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКОМ ПРОСТРАНСТВЕ КЛЕТОК

Фермент	Катализируемая реакция
1. Рибонуклеаза I	Гидролизует РНК
2. Дезоксирибонуклеаза I	Расщепляет фосфодиэфирные связи внутри молекулы ДНК
3. Щелочная фосфатаза	Отщепляет фосфатные группы от ряда органических соединений
4. 5'-нуклеотидаза	Превращает ряд нуклеотидов в нуклеозиды
5. Кислая гексозофосфатаза	Отщепляет фосфатные группы от ряда сахарофосфатов
6. Кислая фосфатаза	Отщепляет фосфатные группы от органических соединений
7. Циклофосфодиэстераза	Превращает циклические рибонуклеозид-2',3'-фосфаты в рибонуклеозид-3'-фосфаты и далее гидролизует их до нуклеозидов
8. Пенициллиназа	Гидролизует и в результате этого инактивирует пенициллин

ными экзоферментами у грамположительных бактерий. Это относится к пенициллиназам, 5'-нуклеотидазам и рибонуклеазам.

Кроме периплазматических ферментов грамотрицательные бактерии образуют и некоторые внеклеточные ферменты, катализирующие расщепление субстратов; остается неясным, почему одни ферменты проходят через внешние слои стенки, тогда как другие задерживаются в периплазме.

ФЕРМЕНТЫ, СВЯЗАННЫЕ С КЛЕТКОЙ

Существует третий класс внеклеточных ферментов (действующих на субстраты, находящиеся с наружной стороны клеточной мембраны), которые остаются всегда прочно связанными с поверхностью клетки. Примерами служат пенициллиназа *Bacillus licheniformis* и ферменты бактерий группы *Cytophaga*, гидролизующие целлюлозу.

МЕХАНИЗМ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКСОФЕРМЕНТОВ

Механизм, посредством которого экзоферменты проходят через мембрану, непроницаемую для других ферментов, находящихся внутри клетки, еще не установлен. Было высказано предположение, что экзоферменты синтезируются на связанных с мембраной рибосомах, с которых они выделяются в среду еще в процессе синтеза в развернутом состоянии. Однако в других исследованиях небольшое количество экзоферментов было обнаружено внутри клетки. Это наводит на мысль, что

они синтезируются обычным путем, а затем избирательно выделяются наружу. Не найдено каких-либо общих свойств экзоферментов, которые могут объяснить их способность к выделению. Хотя большинство из них — относительно небольшие белки (мол. вес в пределах 20 000—40 000), у экзопротеазы *Pseudomonas typhogenes* мол. вес достигает 77 000. Отсутствуют какие-либо доказательства, что экзоферменты соединяются с общим переносчиком, облегчающим их выделение.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Скорость химической реакции является прямой функцией температуры и подчиняется закономерности, впервые описанной Аррениусом:

$$\lg v = \frac{-\Delta H^*}{2,303RT} + C, \quad (10.3)$$

где v — означает скорость реакции, а ΔH^* — энергию активации этой реакции; R — газовая постоянная и T — температура в градусах Кельвина. Поэтому график скорости химической реакции как функции T^{-1} изображается прямой линией с отрицательным наклоном (рис. 10.6). На рис. 10.7 показан аналогичный график скорости роста *E. coli* как функции T^{-1} . Кривая оказывается линейной только в определенном температурном диапазоне, так как скорость роста резко снижается при высоких и низких значениях температуры. Быстрое падение скорости роста при высоких температурах вызывается тепловой денатурацией белков, а возможно, и таких структур клетки, как мембраны. *Максимальная температура роста* — это температура, при которой деструктивные реакции становятся необратимыми. Такая температура обычно лишь на несколько градусов выше, чем *оптимальная температура*, при которой наблюдается максимальная скорость роста.

Исходя из влияния температуры на скорость химической реакции, можно было бы предположить, что все бактерии продолжают расти при снижении температуры (хотя и с постепенно уменьшающейся скоростью) до тех пор, пока система не замерзнет. Однако большинство бактерий перестает расти при температуре, которая намного выше точки замерзания воды (*минимальная температура роста*). Для каждого микроорганизма существует минимальная температура роста, ниже которой рост не наблюдается, как бы долг ни был период инкубации.

Численные значения основных температурных точек (минимальной, оптимальной и максимальной), а также интервал температур, в котором возможен рост, у бактерий сильно варьируют. Некоторые бактерии, выделенные из горячих

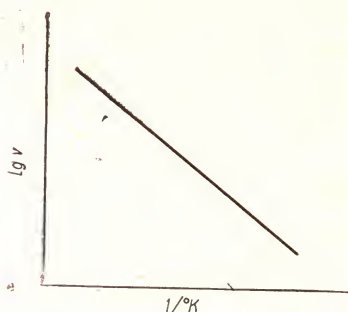


Рис. 10.6. Обобщенный график Аррениуса, отражающий зависимость между скоростью химической реакции и температурой.

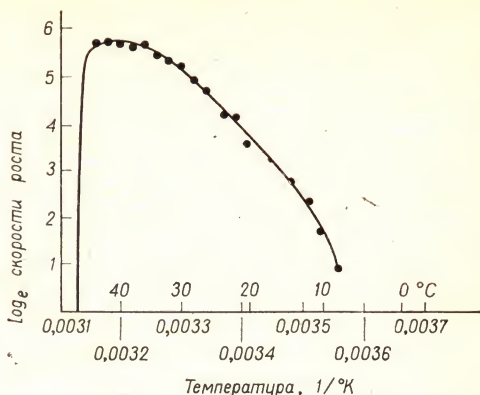


Рис. 10.7. График Аррениуса, отражающий зависимость между скоростью роста *E. coli* и температурой. [Ingraham J. L., Growth of psychrophilic bacteria, J. Bacteriol., 76, 75 (1958).]

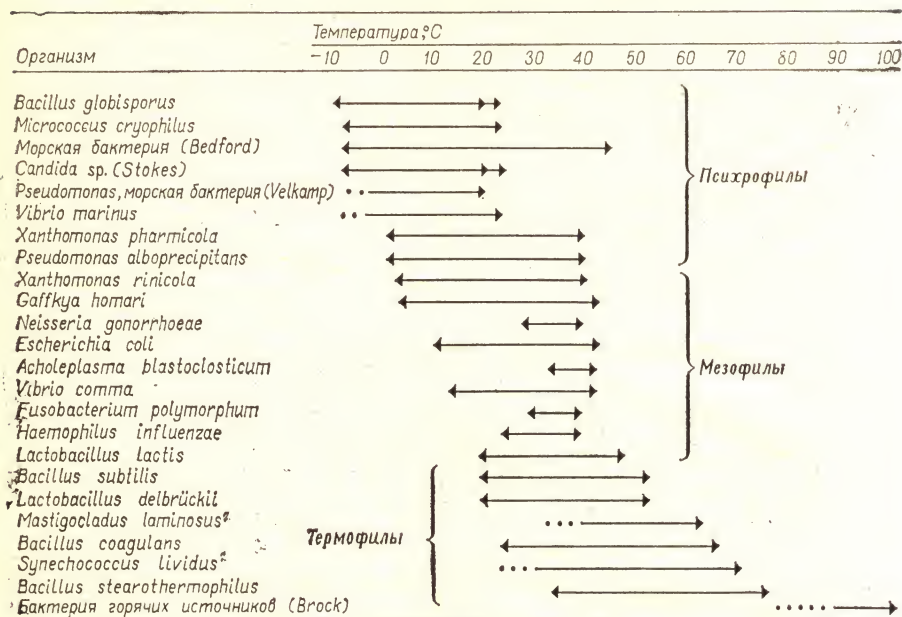
источников, могут расти при такой высокой температуре, как 95 °С. Другие, существующие в холодной среде обитания, растут при очень низких температурах, например при —10 °С, если высокая концентрация солей предотвращает замерзание среды. На основе температурного диапазона роста бактерий часто делят на три большие группы: *термофилы*, растущие при высокой температуре (выше 55 °С); *мезофилы*, растущие в среднем диапазоне температуры (от 20 до 45 °С), и *психрофилы*, хорошо растущие при 0 °С.

Как это часто бывает в системах биологической классификации, такая терминология проводит более резкие различия между типами, чем те, которые наблюдаются в природе. Разделение бактерий на три группы по их реакции на температуру не отражает полностью различий между ними в отношении широты температурного интервала, в котором возможен рост того или иного вида¹.

Представленные в табл. 10.5 данные о температурных интервалах, характерных для роста самых различных бактерий, показывают достаточную условность терминов *термофил*, *мезофил* и *психрофил*. Интервал температур, в котором возможен рост, варьирует так же сильно, как и максимальная и

¹ Различия в температурном диапазоне у термофилов иногда подчеркивают введением терминов *стенотермофилы* (организмы, которые не могут расти ниже 37 °С) и *эвритермофилы* (организмы, которые могут расти ниже этой температуры). Психрофилов, у которых верхний температурный предел превышает 20 °С, называют *факультативными психрофилами*, а тех, которые не могут расти выше 20 °С, — *облигатными психрофилами*.

ТАБЛИЦА 10.5
ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ РОСТА НЕКОТОРЫХ ПРОКАРИОТ¹



¹ Линии, оканчивающиеся одиночными стрелками, показывают температурные пределы роста, установленные хотя бы для одного штамма данного вида; у различных штаммов одного вида эта величина варьирует. Двойные стрелки показывают, что истинное значение температурного предела заключено между температурами, указанными стрелками. Сплошные линии, оканчивающиеся пунктиром, означают, что минимальная температура роста еще не установлена.

² Цианобактерии.

минимальная температуры. Для некоторых бактерий температурный интервал составляет менее 10 градусов, для других — достигает 50 градусов.

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ПРЕДЕЛЫ РОСТА

Выявлению факторов, определяющих температурные пределы роста, способствовали два типа исследований: сравнение особенностей организмов, у которых температурные интервалы сильно различаются, и анализ свойств температурочувствительных мутантов, у которых в результате единичной мутации произошло сужение температурного интервала. Температурочувствительные мутанты бывают двух типов: *мутанты, чувствительные к нагреванию*, у которых снижена максимальная температура роста, и *мутанты, чувствительные к охлаждению*, т. е. организмы с повышенной минимальной температурой роста.

Исследование кинетики тепловой денатурации как ферментов, так и клеточных структур, содержащих белки (например, жгутиков, рибосом), показало, что многие специфические белки термофильных бактерий значительно более устойчивы к нагреванию, чем их гомологи из мезофильных бактерий. Можно также ориентировочно оценить общую термоустойчивость растворимых клеточных белков, если измерить скорость, с которой белок, содержащийся в экстракте бактериальных клеток, переходит в нерастворимое состояние в результате тепловой денатурации, происходящей при нескольких разных температурах. Подобные эксперименты (табл. 10.6) ясно по-

ТАБЛИЦА 10.6

СТАБИЛЬНОСТЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ МЕЗОФИЛЬНЫХ И ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ 60 °C¹⁾

Организм	Отношение к температуре	Содержание денатурированных белков ²⁾ , %
<i>Proteus vulgaris</i>	Мезофил	55
<i>Escherichia coli</i>	»	55
<i>Bacillus megaterium</i>	»	58
<i>Bacillus subtilis</i>	»	57
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Термофил	3
<i>Bacillus</i> sp. (Purdue CD)	»	0
<i>Bacillus</i> sp. (Texas 11330)	»	4
<i>Bacillus</i> sp. (Nebraska 1492)	»	0

¹⁾ Данные из работы: Koffler H., Gale G. O., The relative thermostability of cytoplasmic proteins from thermophilic bacteria, Arch. Biochem. Biophys., 66, 249, (1957).

²⁾ Количество вещества, коагулирующего из ультразвукового экстракта клеток после его нагревания в течение 8 мин при 60 °C, в процентах от общего количества вещества, осаждаемого трихлоруксусной кислотой.

казывают, что практически все белки термофильной бактерии остаются в нативном состоянии после тепловой обработки, которая приводит к денатурации почти всех белков сходного мезофила. Из этого следует, что адаптация термофильного микроорганизма к его температурным условиям может быть достигнута только посредством мутационных изменений, влияющих на первичную структуру большинства (если не всех) белков клетки.

Хотя эволюционные приспособительные изменения, которые привели к появлению термофилов, должны были включать мутации, *увеличивающие* термоустойчивость белков, большинство мутаций, влияющих на первичную структуру специфического белка (например, фермента), снижает термостабильность этого белка. В то же время многие из этих мутаций лишь слабо или совсем не влияют на его каталитические свойства. Следовательно, в отсутствие противоположно направленного отбора под воздействием температуры случайные мутации, влияющие на первичную структуру белков,

должны были привести к постепенному снижению максимальной температуры роста *любого* микроорганизма. Этот вывод подкрепляется наблюдением, что психрофильные бактерии, выделенные из антарктических вод, содержат большое количество белков, чрезвычайно чувствительных к нагреванию.

При низкой температуре все белки претерпевают небольшие конформационные изменения, обусловленные ослаблением в них гидрофобных связей, которые играют важную роль в определении третичной (трехмерной) структуры белковой молекулы. Связи всех других типов в белках становятся прочнее при снижении температуры. Точная конформация особенно важна для правильного функционирования аллостерических белков и для самосборки рибосомных белков, что делает белки этих двух классов исключительно чувствительными к инаktivации на холоду. Поэтому не удивительно, что мутации, повышающие минимальную температуру роста, обычно затрагивают гены, кодирующие эти белки.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ВЫРАЩИВАНИЯ НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК

Липидный состав почти всех организмов, как прокариот, так и эукариот, изменяется при изменении температуры выращивания. При снижении температуры в клеточных липидах увеличивается относительное содержание ненасыщенных жирных кислот.

Табл. 10.7 иллюстрирует это явление у *E. coli*. Подобное изменение липидного состава — существенный компонент температурной адаптации у бактерий. Точка плавления липидов прямо связана с содержанием в них насыщенных жирных кислот. Следовательно, уровень насыщенности жирных кислот в мембранных липидах определяет степень их жидкого со-

ТАБЛИЦА 10.7

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ВЫРАЩИВАНИЯ НА КОЛИЧЕСТВО ГЛАВНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ У *E. COLI*¹⁾

Жирная кислота	Содержание, % ²⁾	
	10 °C	43, °C
Насыщенные жирные кислоты		
Миристиновая	3,9	7,7
Пальмитиновая	18,2	48,0
Ненасыщенные жирные кислоты		
Гексадеценовая	26,0	9,2
Октадеценовая	37,9	12,2

¹⁾ Обратите внимание на то, что выращивание при низкой температуре приводит к резкому увеличению доли ненасыщенных жирных кислот в липидах. Данные из работы: Marr A. G., Ingraham J. L., Effect of temperature on the composition of fatty acids in *E. coli*, *J. Bacteriol.*, 84, 1260 (1962).

²⁾ От общего количества жирных кислот клетки.

стояния при данной температуре. Поскольку функционирование мембран зависит от жидкого состояния липидных компонентов, вполне понятно, что рост организма при низкой температуре должен сопровождаться увеличением степени ненасыщенности жирных кислот.

ОТНОШЕНИЕ К КИСЛОРОДУ

Современная атмосфера Земли содержит примерно 20% (объем/объем) такого высокореакционноспособного газа, как кислород. За исключением ряда бактерий и немногочисленных простейших, все организмы нуждаются в молекулярном кислороде в качестве биогенного элемента. Бактерии могут существенно различаться по своей реакции на кислород. Поэтому он является важным фактором при их культивировании (см. гл. 2). Аэробы нуждаются в O_2 ; факультативные анаэробы используют O_2 , когда он доступен, но могут расти и в его отсутствие. Другие анаэробы, которые совсем не используют O_2 , бывают двух типов: *облигатные анаэробы*, для которых O_2 токсичен, и *аэротолерантные анаэробы*, которые не погибают при контакте с O_2 . Хотя токсичность O_2 лучше всего обнаруживается при его действии на облигатных анаэробов, на самом деле высокие концентрации кислорода токсичны даже для аэробных организмов. Многие облигатные аэробы не могут расти при концентрациях кислорода, превышающих его атмосферную концентрацию (т. е. >20 об. %). Действительно, некоторые облигатные аэробы нуждаются для роста в значительно более низких концентрациях O_2 , чем атмосферная концентрация (от 2 до 10 об. %). Аэробные бактерии, обнаруживающие такую чувствительность к O_2 при всех условиях роста, называются *микроаэрофилами*. Однако часто снижение потребности облигатных аэробов в O_2 является условным и в значительной степени зависящим от источников энергии или азота. Например, многие водородокисляющие бактерии, которые на средах с органическими субстратами переносят атмосферную концентрацию кислорода, нуждаются в гораздо более низкой его концентрации, если в качестве источника энергии используется водород. Некоторые аэробные азотфиксирующие бактерии могут фиксировать N_2 только при практически полном отсутствии O_2 (см. гл. 19).

ТОКСИЧНОСТЬ КИСЛОРОДА: ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

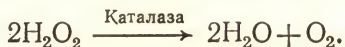
У всех бактерий есть определенные ферменты, способные реагировать с O_2 ; количество и разнообразие этих ферментов определяет физиологическое отношение данного организма к кислороду. При окислении кислородом флавопротеидов в качестве одного из главных продуктов обязательно образуется токсичное соединение — H_2O_2 . Кроме того, в этих окис-

лительных реакциях (а возможно, и в других ферментативных реакциях окисления и присоединения кислорода) образуются небольшие количества еще более токсичного свободного перекисного радикала¹ — $O_2^{\cdot-}$.

У аэробов и аэротолерантных анаэробов потенциально летальному накоплению перекисного радикала ($O_2^{\cdot-}$) препятствует фермент *супероксиддисмутаза*, катализирующий превращение этого радикала в кислород и перекись водорода:



Почти все эти организмы содержат также фермент *каталазу*, который разлагает перекись водорода на кислород и воду:



Только одна группа бактерий, способных расти в присутствии воздуха (молочнокислые бактерии, см. гл. 23), не содержит каталазы. Однако большинство этих организмов не накапливает значительных количеств H_2O_2 , так как она разрушается пероксидазами — ферментами, катализирующими окисление органических соединений под действием H_2O_2 , которая при этом восстанавливается до воды.

Таким образом, супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза защищают клетку от токсичных продуктов кислородного метаболизма. В табл. 10.8 показано распределение супероксиддисмутазы и каталазы у бактерий, различающихся по физиологическим реакциям на O_2 . Организмы, способные пере-

ТАБЛИЦА 10.8

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И КАТАЛАЗЫ У БАКТЕРИЙ С РАЗЛИЧНОЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ НА O_2

Тип бактерий	Содержание	
	супероксиддисмутаза	каталазы
Аэробы или факультативные анаэробы		
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Pseudomonas</i> spp.	+	+
<i>Micrococcus radiodurans</i>	+	+
Аэротолерантные бактерии		
<i>Butyribacterium rettgeri</i>	+	—
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	—
<i>Streptococcus lactis</i>	+	—
Облигатные анаэробы		
<i>Clostridium pasteurianum</i>	—	—
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	—	—

¹ Свободный радикал — соединение с неспаренным электроном, обозначаемым точкой в структурной формуле. Обладая избыточным электроном, перекисный радикал имеет отрицательный заряд.

носить контакт с O_2 , всегда содержат супероксиддисмутазу, хотя далеко не все из них содержат каталазу. Однако ни один из изученных облигатных анаэробов не содержит ни супероксиддисмутазы, ни каталазы¹. Таким образом, по современным данным, супероксиддисмутаза — обязательный фермент для любого организма, контактирующего с воздухом. Недавно было получено прямое подтверждение этого вывода путем выделения мутантов факультативного анаэроба *E. coli*, лишенных данного фермента. Эти мутанты, ставшие облигатными анаэробами, быстро погибали при кратковременном контакте с воздухом.

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

Токсичность O_2 для живых организмов может быть значительно увеличена при выдерживании клеток на свету в присутствии воздуха и определенных пигментов, называемых фотосенсибилизаторами. Свет переводит фотосенсибилизатор (P) в высокореакционноспособную форму, известную как триплетное состояние фотосенсибилизатора (P^*):



В результате вторичной реакции между P^* и O_2 кислород переходит в синглетное состояние (1O_2):



Подобно перекисному радикалу, синглетный кислород является очень сильным окислителем, поэтому клетки, в которых он образуется, быстро погибают.

Одна из основных биологических функций каротиноидных пигментов состоит в «тушении» синглетного состояния кислорода и предохранении клетки от фотодинамической гибели. Эта функция особенно важна для фототрофов, так как хлорофиллы — сильные фотосенсибилизаторы; фотосинтезирующий аппарат обязательно содержит каротиноидные пигменты. Впервые их роль в предотвращении летального фотоокисления, инициируемого хлорофиллом, была показана для пурпурной бактерии *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Эта бактерия растет фототрофно в строго анаэробных условиях (см. гл. 17), но может расти также и в аэробных условиях (см. свету или в темноте. Мутанты сине-зеленого цвета, утратившие способность синтезировать окрашенные каротиноиды, все еще могут нормально расти в анаэробных условиях на свету или в аэробных в темноте, но быстро погибают при одновременном воздействии света и воздуха. У фототрофных организмов, выделяющих O_2 в качестве продукта фотосинтеза, утрата окрашенных каротиноидов полностью подавляет фотосинтетическую функцию, так как освещение клеток при-

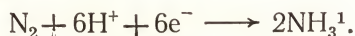
¹ В настоящее время показано, что некоторые облигатные анаэробы образуют супероксиддисмутазу и каталазу. — Прим. ред.

водит к немедленному накоплению синглетного кислорода, образующегося из метаболического O_2 .

Многие аэробные нефотосинтезирующие микроорганизмы также синтезируют каротиноидные пигменты, которые включаются в клеточную мембрану и функционируют как «тушители» синглетного кислорода, образующегося при взаимодействии O_2 с такими фотосенсибилизирующими клеточными пигментами, как цитохромы. Роль каротиноидов в предохранении аэробных бактерий от фотодинамического действия солнечного света была показана при изучении светочувствительности непигментированных мутантов *Micrococcus luteus* и *Halo-bacterium salinarium*. Такое защитное действие, вероятно, существенно в экологическом отношении для всех аэробных бактерий, живущих в условиях высоких интенсивностей света.

ФЕРМЕНТЫ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К КИСЛОРОДУ

Многие ферменты, особенно у облигатных анаэробов, быстро и необратимо денатурируются при контакте с O_2 . Поэтому их очистка и изучение должны проводиться в полностью анаэробных условиях. Наглядным примером служит *нитрогеназа*, фермент, ответственный за фиксацию азота и катализирующий реакцию



Даже в случае облигатно аэробных азотфиксирующих бактерий, таких, как группа *Azotobacter*, выделенные из клеток нитрогеназы оказываются чрезвычайно чувствительными к кислороду. Очевидно, в интактных клетках *Azotobacter* нитрогеназа защищена от инактивации, но механизм такой защиты не известен. Нитрогеназы факультативно анаэробных азотфиксирующих бактерий (*Enterobacter*, *Bacillus polymyxa*) недостаточно хорошо защищены и в интактных клетках, поэтому эти бактерии могут эффективно фиксировать азот только при анаэробных условиях выращивания. Большинство нитчатых азотфиксирующих цианобактерий образует специализированные клетки (гетероцисты), дефектные по фотосистеме II, благодаря чему нитрогеназа в них защищена от инактивации кислородом (см. гл. 17).

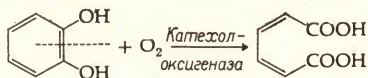
РОЛЬ ОКСИГЕНАЗ

У АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Хотя первичная метаболическая функция O_2 у облигатных аэробов состоит в том, что он служит конечным акцептором электронов, кислород является также *косубстратом* для ферментов, катализирующих некоторые этапы диссимилиации ароматических соединений и алканов. Эти ферменты называются *оксигеназами*; с их помощью происходит прямое при-

¹ Эта реакция может протекать также следующим образом:
 $N_2 + 8H^+ + 8e^- \longrightarrow 2NH_3 + H_2$. — Прим. ред.

соединение одного или двух атомов кислорода к органическому субстрату. Для примера можно привести окислительное расщепление кольца катехина — промежуточного продукта диссимиляции многих ароматических соединений:



Многие аэробные псевдомонады, для которых ароматические соединения или алканы служат единственными источниками углерода и энергии, являются денитрификаторами и поэтому способны расти анаэробно, используя в качестве конечного акцептора электронов нитрат вместо O_2 . Однако такая метаболическая замена может быть осуществлена только в присутствии субстратов, окисляемых в процессе катаболизма дегидрогеназами. Субстраты, при диссимиляции которых один или более этапов протекают при участии оксигеназ, не могут обеспечивать рост в анаэробных условиях, так как нитрат не заменяет O_2 в качестве косубстрата этих ферментов.

У эукариот биосинтез стерина и ненасыщенных жирных кислот включает этапы, осуществляемые оксигеназами. Поэтому дрожжи нуждаются в стеринах и ненасыщенных жирных кислотах как факторах роста, если они растут в анаэробных условиях за счет брожения, хотя в аэробных условиях они сами могут синтезировать эти клеточные компоненты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

Precht H. (ed.), 1973, *Temperature and Life*, Heidelberg, Springer Verlag.

Обзоры и оригинальные работы

Brown A. D. (1964), Aspects of Bacterial Response to the Ionic Environment, *Bact. Revs.*, 28, 296.

Heppel L. A., 1971, The Concept of Periplasmic Enzymes, in *Structure and Function of Biological Membranes*, L. I. Rothfield (ed.), New York and London, Academic Press.

Larsen H. (1973), The Halophiles' Confusion to Biology, *Antonie van Leeuwenhoek*, 39, 383.

Lin E. C. C., 1971, The Molecular Bases of Membrane Transport Systems, in *Structure and Function of Biological Membranes*, L. I. Rothfield (ed.), p. 286, New York and London, Academic Press.

MacLeod R. A. (1968), On the Role of Inorganic Ions in the Physiology of Marine Bacteria, *Advances in Microbiology of the Sea*, 1, 95.

Morris J. G. (1975), The Physiology of Obligate Anaerobiosis, *Adv. Microbiol. Physiol.*, 12, 169.

Pollock M. R., 1964, Exoenzymes, in the *Bacteria*, R. Y. Stanier and I. C. Gunsalus (eds.), Vol. I, New York and London, Academic Press.

Stanier R. Y. (1974), The Relationship between Nitrogen Fixation and Photosynthesis, *Aust. J. Expt. Biol. Med. Sci.*, 52, 3.

II ВЗАИМООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И ФУНКЦИЕЙ В КЛЕТКАХ ПРОКАРИОТ

Строение прокариотической клетки рассмотрено в гл. 3 и 5. В этой главе мы более детально обсудим организацию некоторых из ее составных частей, а также взаимоотношение между их структурой и функцией.

ПОВЕРХНОСТНЫЕ СТРУКТУРЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

До тех пор пока М. Солтон (M. Salton) не разработал в 1952 г. методы выделения и очистки клеточных стенок (рис. 11.1), о составе и функциях внешних слоев бактериальных клеток было известно очень мало. Первые химические анализы таких препаратов выявили сложность и разнообразие состава бактериальных стенок, а также основные различия в составе стенок у грамположительных и грамотрицательных бактерий, что обсуждалось в гл. 5 (стр. 169).

Солтон показал, что гидролитический фермент лизоцим, ранее известный как агент, лизирующий многие грамположительные бактерии, способен полностью разрушать выделенные клеточные стенки такого организма, как *Bacillus megaterium*. Это наблюдение дало возможность Вейбелу (C. Weibull) осуществить в 1953 г. простой эксперимент, который ясно продемонстрировал функции, присущие бактериальной стенке и мембране (рис. 11.2). Если клетки *B. megaterium* до обработки лизоцимом поместить в изотонический раствор сахарозы, то последующее ферментативное растворение стенки приводит к превращению исходных палочковидных клеток в сферические *протопласты*, которые полностью сохраняют дыхательную активность и могут синтезировать белок и нуклеиновую кислоту. Протопласты, помещенные после удаления лизоцима в среду, обеспечивающую хороший рост интактных клеток, не способны ресинтезировать клеточную стенку, но могут увеличиваться в размере и обладают ограниченной способностью к репродукции. Однако при некоторых специальных условиях культивирования в протопластах можно индуцировать регенерацию клеточных стенок, и они вновь приобретают палочковидную форму.

При разбавлении суспензии протопластов они подвергаются немедленному осмотическому лизису. Единственные структурные элементы, сохраняющиеся после такого лизиса, представляют собой пустые клеточные мембраны, или «тени», которые можно легко выделить и очистить дифференциальным центрифугированием. Изучение подобных препаратов, по-

Рис. 11.1. Электронная микрофотография выделенных и очищенных клеточных стенок *Bacillus megaterium*. (Stanier R. Y., Some singular

features of bacteria as dynamic systems in Cellular Metabolism and Infection, E. Racker (ed.), New York, Academic Press, 1954.) Видны бе-

лые сферические частицы латекса, диаметр которых равен точно 0,25 мкм. Они включены в препарат, чтобы показать масштаб увеличения.

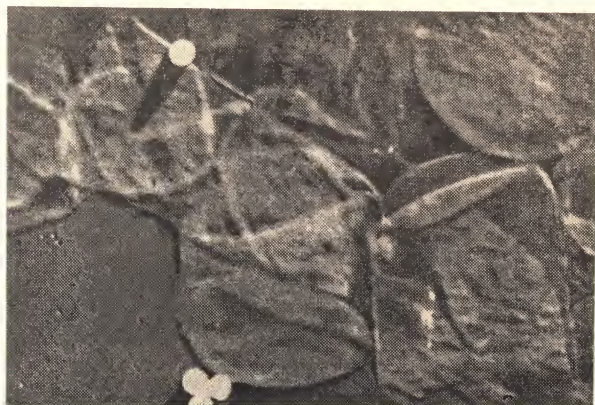
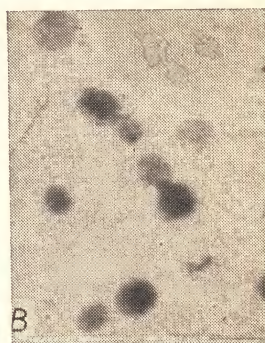


Рис. 11.2. Клетки *Bacillus megaterium* (фазовый контраст, $\times 3000$). (Фото предоставлено С. Вейбелом.) А. Интактные клетки. Б. Сфе-

рические протопласты, образовавшиеся в изотонической среде при ферментативном растворении клеточной стенки под действием лизо-

цима. В. Тени (т. е. пустые цитоплазматические мембраны), образовавшиеся при осмотическом разрушении клеток в гипотонической среде.



лученных из обработанных лизоцимом грамположительных бактерий, дало много сведений о свойствах бактериальной клеточной мембраны.

Эксперимент Вейбела показал, что клеточная стенка выполняет жизненно важную механическую функцию: она предохраняет клетку от осмотического лизиса в гипотонической среде. Кроме того, она определяет форму клетки и, по-види-

тому, играет роль в процессах движения и деления. Однако стенка (по крайней мере у грамположительных бактерий) не участвует в метаболических процессах и не является осмотическим барьером.

Кроме стенки и мембраны, прокариотическая клетка может быть окружена рыхлым внешним слоем, называемым *капсулой* или *слизистым слоем*. На поверхности клеток многих бактерий находятся нитевидные органеллы двух типов: *жгутики* и *пили*.

В табл. 11.1 суммированы характерные свойства различных поверхностных структур прокариотической клетки.

ТАБЛИЦА 11.1

ПОВЕРХНОСТНЫЕ СТРУКТУРЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Структура	Локализация	Строение и размеры	Химический состав
Мембрана	Слой, окружающий протопласт	Элементарная мембрана, толщина 7,5—8 нм	В основном белки и 20—30% фосфолипидов
Стенка	Слой, прилегающий снаружи к мембране	<i>Грамотрицательные организмы</i>	
		Одинарный внутренний слой, толщина 2—3 нм	Пептидогликан
		Внешний слой, сходный с элементарной мембраной, толщина 7—8 нм	Фосфолипиды, белки, липополисахариды
		<i>Грамположительные организмы</i>	
		Гомогенный слой, толщина 10—50 нм	Пептидогликан, тейхоевые кислоты, полисахариды
Капсула или слизистый слой	Диффузный слой, расположенный с наружной стороны стенки	Гомогенная структура низкой плотности и разной толщины	Различный (обычно полисахариды, редко полипептиды)
Жгутики	Закреплены в протопласте, проходят через мембрану и стенку	Спиральные нити, толщина 12—18 нм	Белок
Пили	Закреплены в протопласте, проходят через мембрану и стенку	Прямые нити, толщина 4—35 нм	Белок

КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА

Бактериальная клеточная мембрана, которая ограничивает протопласт и служит основным осмотическим барьером, видна на электронных микрофотографиях ультратонких срезов

Рис. 11.3. Общая структура фосфолипидов. Эти соединения являются производными глицерин-3-фосфата. Гидроксильные группы при атомах углерода в положениях 1 и 2 этерифицированы

длинноцепочечными жирными кислотами с образованием ацильных остатков, которые составляют гидрофобный «хвост» молекулы. Фосфатная группа, этерифицирующая углеродный

атом 3, может иметь ряд заместителей (обозначенных —R), включая глицерин, его аминокислотные производные и этаноламин. Эта часть составляет гидрофильную «голову» молекулы.

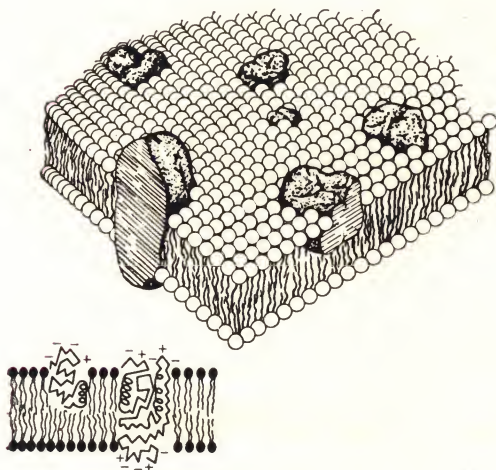
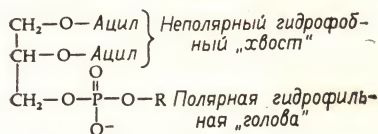


Рис. 11.4. Схема, изображающая предполагаемую молекулярную организацию элементарной мембраны. Полипептиды представлены в виде свернутых молекул, погруженных в двойной липидный слой, причем их гидрофильные участки выходят за пределы двойного слоя с одной или обеих его сторон. [(Singer S. J., Nicholson A. L., The fluid membrane model of the structure of cell membranes, Science, 175, 720 (1972).]

клеток как двойная линия шириной около 8 нм; подобная тонкая структура характерна для всех так называемых *элементарных мембран*. Она состоит из двойного слоя фосфолипидов (рис. 11.3), которые являются основными липидами мембран бактериальных клеток и составляют около 20—30% их сухой массы. Полярные «головы» фосфолипидов расположены на обеих внешних поверхностях двойного слоя, тогда как гидрофобные цепочки жирных кислот размещаются в центральной части мембраны, перпендикулярно к ее плоскости (рис. 11.4). Мембранные белки, составляющие более половины сухой массы мембраны, включены в этот двойной слой фосфолипидов.

Изолированные мембраны — высокопластичные структуры. Путем обработки детергентами можно вызвать их дезагрегацию, а затем реконструировать новые мембраноподобные структуры. Кроме того, края мембранных фрагментов могут замыкаться с образованием закрытых пузырьков, по



Рис. 11.5. Электронная микрофотография ультратонкого среза делящейся клетки *Bacillus megaterium*, содержащей три мезосомы (1). Одна из них связана с близко расположенной поперечной перегородкой и стенкой. [(Ellar D. J., Lindgren D., Slepceky R. A., Fine structure of *Bacillus megaterium* during synchronous growth, J. Bact., 94, 1189 (1967).]

своей проницаемости сходных с теми клетками, из которых они были получены.

Мембрана бактериальной клетки — это важный центр метаболической активности; она содержит разнообразные белки, каждый из которых, по-видимому, выполняет специфические каталитические функции. Большая часть этих белков прочно связана с гидрофобной зоной мембраны, из которой их можно извлечь только с помощью методов, вызывающих их инактивацию (например, обработкой детергентами). Основные классы мембранных белков включают: 1) пермеазы, ответственные за перенос многих органических и неорганических питательных веществ в клетку, и 2) биосинтетические ферменты, которые осуществляют конечные этапы синтеза мембранных липидов, а также макромолекул различных классов, входящих в состав бактериальной клеточной стенки (пептидогликанов, тейхоевых кислот, липополисахаридов и обычных полисахаридов).

Кроме того, бактериальная мембрана часто содержит важные компоненты аппарата генерации АТФ. У аэробных бактерий компоненты цепи переноса электронов также связаны с мембраной. У пурпурных бактерий в мембране локализован весь фотосинтезирующий аппарат (пигменты, реакционные центры, фотосинтетическая цепь переноса электронов). С клеточной мембраной, по-видимому, всегда связана АТФаза. Наконец, многочисленные косвенные данные свидетельствуют о том, что мембрана прокариотической клетки со-

Рис. 11.6. Электронная микрофотография целых клеток *Caulobacter crescentus*, негативно окрашенных фосфовольфра-

матом, который проникает в мезосомы — спиральные образования клеточной мембраны — и четко обрисовывает

места их расположения ($\times 22\,100$). (Фото предоставлено Жерменой Коэн-Базир.)

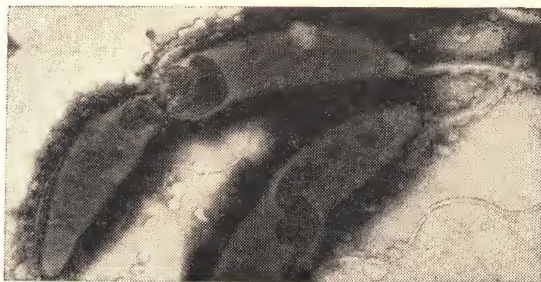


Рис. 11.7. Электронные микрофотографии ультратонких срезов некоторых пурпурных бактерий, иллюстрирующие изменчивость строения внутренних мембран. А. Клетка *Rhodopseudomonas sphaeroides*, в которой мембраны имеют вид полых пузырьков (стрелки) ($\times 5640$). Б. Клетка

Rhodopseudomonas palustris, в которой мембраны расположены правильными параллельными слоями в кортикальной области клетки (стрелки) ($\times 5640$). В. Клетка *Rhodospirillum fulvum*, в которой мембраны состоят из небольших регулярно расположенных стопок (стрелки) ($\times 42\,300$).

Г. Клетка *Thiocapsa* sp., в которой мембраны имеют трубчатую структуру, некоторые из трубочек срезаны в продольном (1), другие — в поперечном (2) направлениях ($\times 54\,000$). (Микрофотографии А, Б и В предоставлены Жерменой Коэн-Базир, микрофотография Г — К. Эймхелленом.)

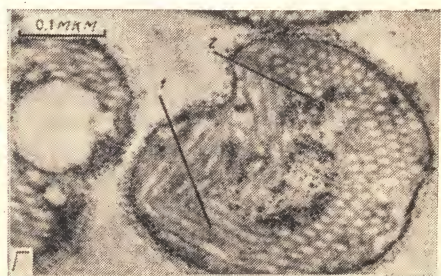
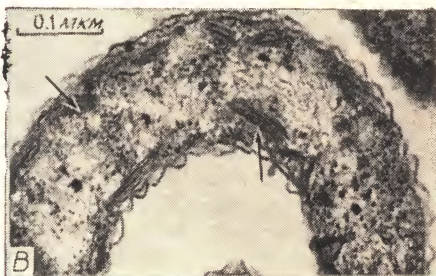
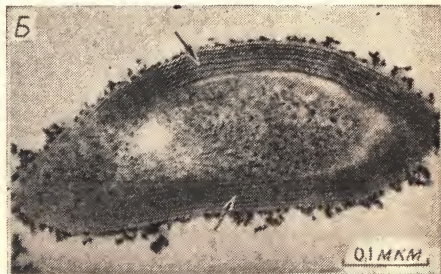
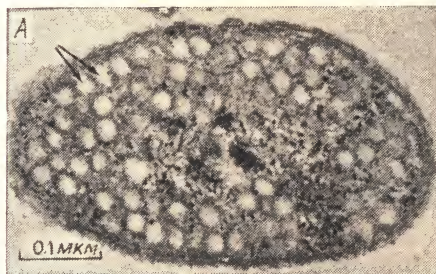


Рис. 11.8. Электронная микрофотография ультратонкого среза азотфиксирующей бактерии *Azotobacter vinelandii*,

на которой видны везикулярные впячивания мембраны, сходные с аналогичными структурами некоторых фото-

трофных бактерий (см. рис. 11.7). (Фото предоставлено Ж. Пэнгборном и А. Марром.)

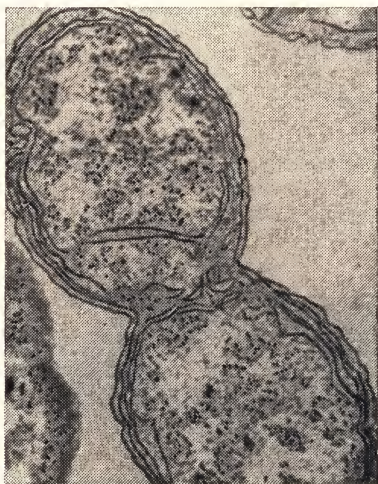
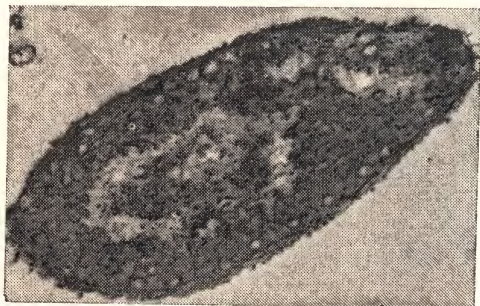


Рис. 11.9. Электронная микрофотография ультратонкого среза облигатного хемоавтотрофа *Nitrosomonas europaea*, на которой видны мембранные впячивания ($\times 39\,100$). (Фото предоставлено С. Уотсоном.)

держит особые участки для присоединения хромосомы и плазмид, играющие активную роль как в репликации, так и в последующей сегрегации этих генетических элементов. В связи с многочисленными и важными функциями бактериальной мембраны не удивительно, что она содержит от 10 до 20% общего белка клетки.

Хотя толщина клеточной мембраны постоянна (поскольку определяется молекулярной конфигурацией двойного фосфолипидного слоя), ее площадь может изменяться. У одних бактерий мембрана, по-видимому, имеет простой контур, соответствующий контуру клеточной стенки. У других — она образу-

Рис. 11.10. Электронные микрофотографии продольных срезов фототрофной бактерии *Rhodospirillum rubrum* (X52 700), которые показывают, что условия выращивания влияют на

степень впячивания цитоплазматической мембраны. А. Клетка из культуры, выращенной при сильном освещении (1000 фут-свечей), содержащая относительно мало хлорофилла.

Б. Клетка из культуры, выращенной при слабом освещении (50 фут-свечей), с высоким содержанием хлорофилла (Фото предоставлено Жерменой Коэн-Базир.)



ет в одной или нескольких точках выступы в сторону цитоплазмы.

У многих бактерий в центрах клеточного деления или вблизи них встречаются сложные локальные впячивания мембраны, называемые *мезосомами* (рис. 11.5), которые, вероятно, участвуют в построении поперечной перегородки. Непрерывность мезосомы и наружной поверхности мембраны, не всегда очевидная на ультратонких срезах, обнаруживается на электронных микрофотографиях целых клеток, негативно окрашенных солями тяжелых металлов, которые проходят через клеточную стенку, но не проникают в цитоплазму (рис. 11.6).

Мембранные впячивания другого типа встречаются у пурпурных бактерий (рис. 11.7) и у многих нефотосинтезирующих бактерий, обладающих высоким уровнем дыхательной активности, таких, как азотфиксаторы группы *Azotobacter* (рис. 11.8) и нитрифицирующие бактерии (рис. 11.9). Возможно, что значительное увеличение общей поверхности мем-

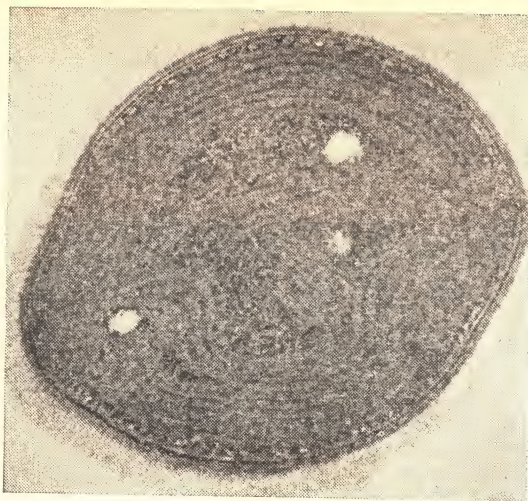


Рис. 11.11. Электронная микрофотография ультратонкого среза одноклеточной цианобактерии, на которой видна развитая система внутренних мембран (тилакоидов), характерная для этой группы прокариот ($\times 29\,000$). (Фото предоставлено Жермной Козн-Базир.)

браны, связанное с образованием впячиваний, обусловлено тем, что на такой мембране можно разместить большее число центров дыхательной (или фотосинтетической) активности, чем на мембране простого контура. Наиболее убедительные данные в пользу такого предположения получены при изучении структуры мембран ряда пурпурных бактерий, у которых содержание пигментов (а следовательно, и фотосинтетическая активность) могут сильно изменяться в зависимости от условий окружающей среды (интенсивности света, наличия или отсутствия кислорода). В этом случае протяженность мембранных впячиваний прямо пропорциональна содержанию пигментов и фотосинтетической активности клеток (рис. 11.10).

У большинства прокариот существует физическая непрерывность поверхности мембранных впячиваний и клеточной мембраны. Возможно, однако, что цианобактерии являются исключением из этого правила. У этих организмов фотосинтезирующий аппарат представлен системой уплотненных мембранных камер (тилакоидов), которые редко обнаруживают связь с клеточной мембраной и большей частью физически отделены от нее (рис. 11.11). Если это так, то цианобактерии составляют единственную группу прокариот, обладающих дифференцированной интрацитоплазматической системой элементарных мембран.

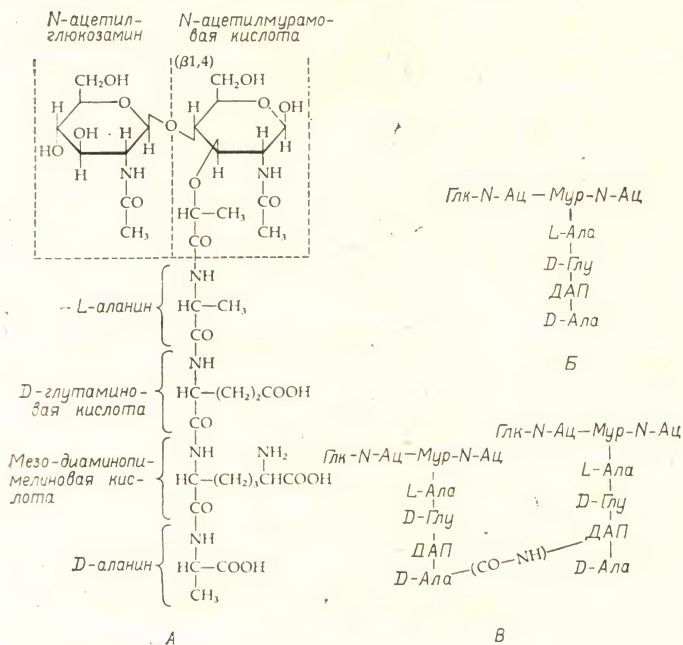
БАКТЕРИАЛЬНАЯ КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА: ПЕПТИДОГЛИКАНОВЫЙ КОМПОНЕНТ

Из многих классов макромолекул, которые связаны со стенками прокариотических клеток, лишь один класс, а именно *пептидогликаны*, имеет почти универсальное распространение.

Рис. 11.12. Общая структура пептидогликана. А. Полная структура отдельной субъединицы, на которой показана связь между двумя аminosахарами, входящими в состав гликановой цепи, а также между мурамовой

кислотой и четырьмя аминокислотами короткой пептидной цепочки. Б. Схематическое, упрощенное изображение структуры, показанной на А. В. Способ образования поперечной связи между концевой

карбоксильной группой D-аланина одной субъединицы и свободной аминогруппой диамино-кислоты (диаминопимелиновой кислоты) соседней субъединицы.



Единственные прокариоты, у которых стенки лишены пептидогликанов, — это *Halobacterium* и *Halococcus*¹. Оба эти организма — крайние галофилы, и прочная клеточная стенка для них не является необходимой, так как содержимое их клеток изотонично с окружающей жидкостью.

Пептидогликаны — гетерополимеры характерного состава и структуры, синтезируемые исключительно прокариотами. Их мономерными компонентами являются два ацетилированных моносахара — N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмуравья кислота, а также небольшое число аминокислот, причем некоторые из них являются «неприродными» в том смысле, что они никогда не встречаются в белках (рис. 11.12). Эти два моносахара образуют цепи гликанов, состоящие из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина (Г) и N-ацетилмура-

¹ Пептидогликаны не обнаружены также у некоторых метанобразующих бактерий. — Прим. ред.

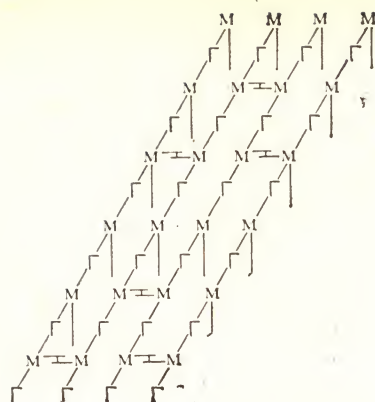


Рис. 11.13. Схема строения интактного пептидогликанового мешка *E. coli*. Г и М представляют соответственно остатки N-ацетилглюкозаминна и N-ацетилмуравовой кислоты, соединенные β -1,4-гликозидными связями (диагональные линии). Вертикальные линии соответствуют свободным тетрапептидным боковым цепям, присоединенным к остаткам муравовой кислоты и связанным между собой поперечными сшивками (обозначены двумя горизонтальными черточками, соединенными одной вертикальной). [(Ghuysen J. M., Bacteriolytic enzymes in the determination of wall structure, Bact. Rev., 32, 425 (1968).]

мовой кислоты (М), соединенных β -(1 \rightarrow 4)-связью. Каждая цепь содержит от 10 до 65 дисахаридных единиц.

Муравовая кислота представляет собой эфир глюкозаминна и молочной кислоты, карбоксильная группа которой является местом присоединения пептидной цепи. Некоторые из карбоксильных групп муравовой кислоты в пептидогликанах связаны с цепочкой из четырех аминокислот. Наиболее обычный порядок их расположения следующий: Муравовая кислота \rightarrow L-аланин \rightarrow D-глутаминовая кислота \rightarrow L-диаминокислота \rightarrow D-аланин-COON. Отметим, что в этой цепи чередуются аминокислоты L- и D-конфигурации, в то время как белки состоят исключительно из L-аминокислот. Соседние пептидные цепи в пептидогликане соединены между собой поперечными сшивками, возникающими обычно вследствие образования пептидной связи между концевым D-аланином в положении 4 одной цепи и свободной аминогруппой диаминокислоты другой цепи. Поперечное связывание иногда осуществляется с помощью межпептидного мостика, содержащего от 1 до 6 аминокислотных остатков.

Два типа связей (гликозидные и пептидные связи), которые соединяют субъединицы пептидогликанов, придают этим гетерополимерам структуру молекулярной сети или ткани (рис. 11.13). Фактически пептидогликановый слой бактериальной клеточной стенки — это мешковидная макромолекула

огромного размера, которая полностью окружает и изолирует протопласт, уравнивая его тургорное давление.

Первичная структура пептидогликана, представленная на рис. 11.12, является наиболее распространенной; она обнаружена в стенках почти всех грамотрицательных и многих грамположительных бактерий. Однако встречается и целый ряд незначительных отклонений от этой структуры, особенно у грамположительных бактерий. Мезо-диаминопимелиновая кислота может быть заменена другими диаминокислотами; встречаются также различные по длине и аминокислотному составу межпептидные мостики, а способ образования поперечных связей между тетрапептидными цепочками может отличаться от показанного на рис. 11.12. Первичная структура пептидогликана клеточной стенки — важный таксономический признак грамположительных бактерий, она рассматривается далее в гл. 22 и 23. У грамотрицательных бактерий единственное хорошо известное отклонение от первичной структуры, приведенной на рис. 11.12, обнаружено в случае спирохет, у которых мезо-диаминопимелиновая кислота заменена на L-орнитин.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПЕПТИДОГЛИКАНА В СТЕНКАХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

В стенках грамотрицательных бактерий содержание пептидогликана невелико и редко превышает 5—10% веса стенки. Локализация пептидогликанового слоя в стенках этого типа впервые была установлена Вейделом (W. Weidel) с сотрудниками для стенок *Escherichia coli*. Они показали, что пептидогликан составляет самый внутренний слой многослойной стенки и может быть выделен в виде очень тонкого мешочка, сохраняющего форму и размер исходной клетки, после удаления других компонентов стенки соответствующими воздействиями (рис. 11.14).

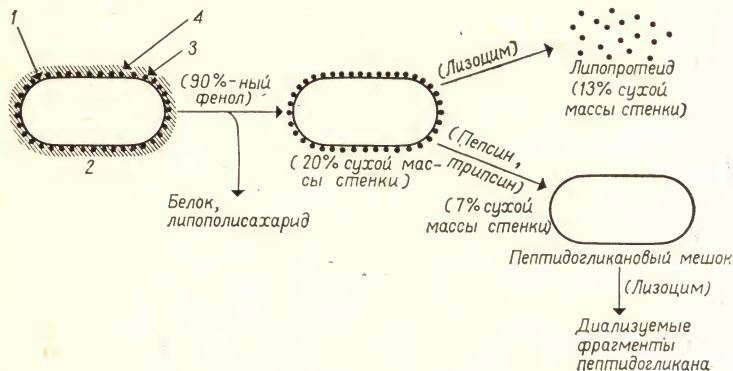
Для пептидогликанов грамотрицательных бактерий характерно довольно низкое содержание поперечных сшивок гликановых цепей: некоторые пептидные цепочки вообще не соединены поперечными связями (рис. 11.13). У разных групп грамотрицательных бактерий толщина пептидогликанового слоя несколько варьирует. Расчеты показывают, что у большинства грамотрицательных организмов он является мономолекулярным (или, самое большее, бимолекулярным) слоем.

Поверх тонкого пептидогликанового мешка, характерного для грамотрицательных бактерий, располагается *внешний слой стенки*, толщина и тонкая структура которого типичны для элементарной мембраны. Физическое отделение этого слоя (часто называемого *внешней мембраной*) от клеточной мембраны осуществляется с трудом. Поэтому все еще суще-

Рис. 11.14. Схема последовательных этапов фракционирования клеточной стенки *E. coli*.

1 — пептидогликан; 2 — изолированная клеточная стенка; 3 — липопротенд; 4 — белок +

+ липополисахарид. (Воспроизведено по экспериментам У. Уэйдела, Х. Фрэнка и Х. Мартина.)



ствуют некоторые сомнения относительно его точного химического состава. Тем не менее известно, что его главными химическими компонентами являются **белки**, **фосфолипиды** и **липополисахариды**. Фосфолипиды, входящие в состав внешнего слоя стенки, качественно сходны с фосфолипидами клеточной мембраны. Белки же в основном (а может быть, и полностью) отличаются от белков клеточной мембраны, и число их ограничено (вполне вероятно, что их только 5).

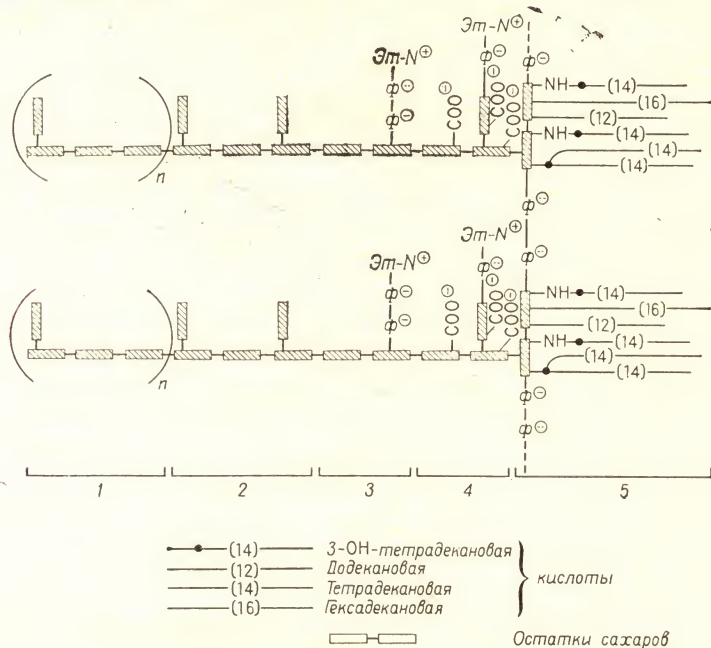
Липополисахариды — главные компоненты внешнего слоя стенки большинства, если не всех, грамотрицательных бактерий — это крайне сложные молекулы с мол. весом свыше 10 000; к тому же химический состав этих соединений заметно варьирует как внутри отдельных групп грамотрицательных бактерий, так и между группами. Большая часть работы по выяснению их структуры была проведена на липополисахаридах бактерий группы *Salmonella*, и пока не известно, свойственны ли другим группам грамотрицательных организмов общие закономерности строения липополисахаридов, установленные для данных бактерий.

Липополисахариды разных видов *Salmonella* представляют собой олигомеры, содержащие в среднем около трех мономерных субъединиц. Каждая субъединица состоит из трех разных участков: липида А, остова R и О-замещенной боковой цепи. Субъединицы связаны между собой фосфатными мостиками в области липида А (рис. 11.15). Участок липида А представляет собой дисахарид, построенный из двух фосфорилированных остатков глюкозамина, многократно этерифицированных длинноцепочечными жирными кислотами, что придает гидрофобность данной области молекулы. К одному из остатков глюкозамина, входящего в состав липида А, присоединен олигосахаридный остов R — короткая цепочка са-

Рис. 11.15. Схематическое изображение двух субъединиц молекулы липополисахарида, соединенных между собой поперечной связью. Размеры компонентов молекулы даны без со-

блюдения масштаба. 1 — О-замещенная боковая цепь; 2 — внешний остов; 3 — дигептозный участок; 4 — участок (КДО)₃; 5 — липид А. Эт-N — этаноламин, КДО — 2-кето-3-дезок-

сиоктоновая кислота. (Nikkaido H., Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide, in Bacterial membranes and walls, L. Leive (ed.), New York, Marcel Dekker, 1973.)



харов, включающая два необычных соединения: 2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту (КДО) и гептозу (рис. 11.16). Остов R в свою очередь соединен с гидрофильной О-замещенной боковой цепью, также состоящей из сахаров. Она значительно длиннее, чем остов R, и построена из повторяющихся тетра- и пентасахаридных блоков. Полная структура липополисахарида *Salmonella typhimurium* показана на рис. 11.17. Установление этой структуры оказалось возможным благодаря получению мутантов, у которых блокированы отдельные этапы биосинтеза липополисахарида. Его биосинтез протекает строго последовательно и начинается с участка липида А, к которому постепенно присоединяются остатки сахаров, входящие в состав полисахаридного остова; О-замещенная боковая цепь образуется последней. Самая внутренняя часть липополисахарида, состоящая из липида А и трех остатков кетодезоксиктоната остова R, по-видимому, необходима для сохранения жизнеспособности бактерий: мутантов, у которых блокирован ее биосинтез, вы-

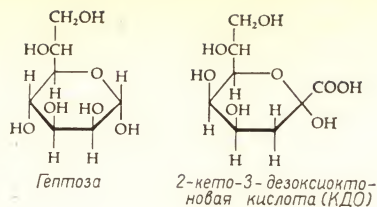


Рис. 11.16. Структура семи- и восьмиуглеродных компонентов липополисахаридного остова.

Рис. 11.17. Структура субъединицы липополисахарида из клеток *Salmonella typhimurium*. 1 — О-замещенная боковая цепь; 2 — остов R, 3 — олигосахаридный остов; 4 — липид А. Абс — абеквоза; Ман — D-манноза; Рам — L-рамноза; Гал — D-галактоза; Глк-N-Ац —

N-ацетил-D-глюкозамин; Глк — D-глюкоза; Геп — гептоза; КДО — 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота; Эт-N — этанол-амин, Ац — ацетил. Биосинтез субъединицы начинается с конца, содержащего липид А, причем молекула постепенно удлиняется путем последовательного

присоединения остатков сахаров. Специфические этапы биосинтеза, блокированные у «шероховатых» мутантов разных классов, показаны пунктиром. (Nikkaido H., Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide, in Bacterial membranes and walls, L. Leive (ed.), New York, Marce Dekker, 1973.)

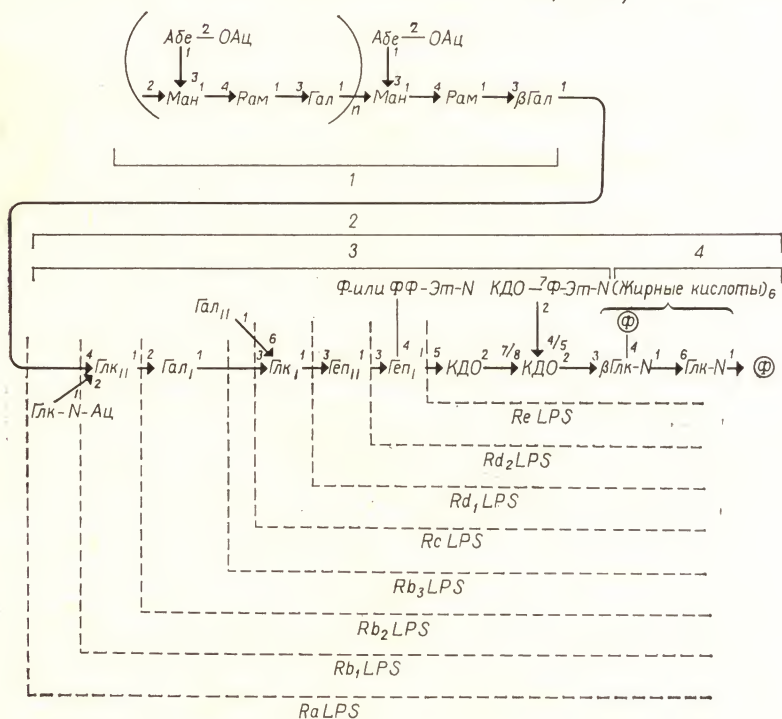
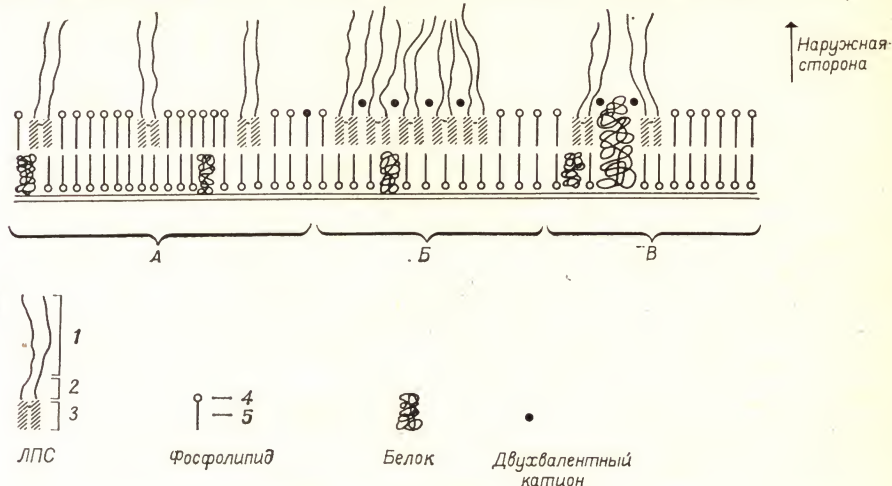


Рис. 11.18. Предполагаемое расположение основных компонентов внешнего слоя клеточной стенки у грамотрицательных бактерий. 1 —

О-замещенная боковая цепь; 2 — остов, 3 — липид А; 4 — полярная голова; 5 — углеводородная цепь. ЛПС — липополисахарид. (Nikkaido

H., Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide, in Bacterial membranes and walls, L. Leive (ed.), New York, Marcel Dekker, 1973.)



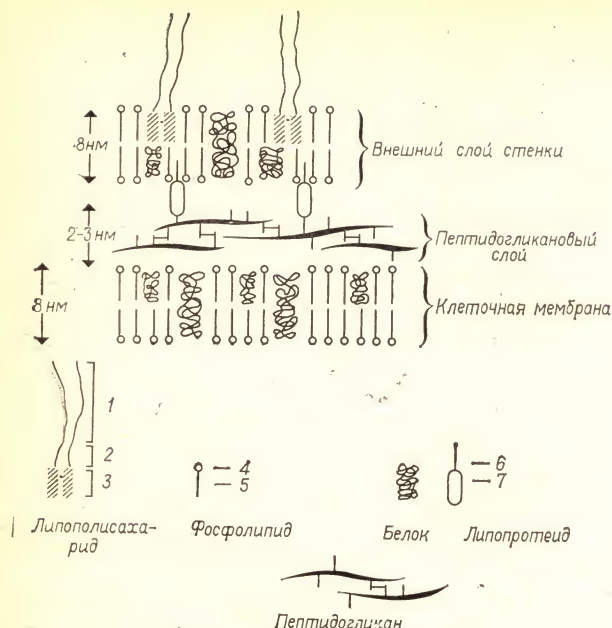
делить не удалось. Однако остальная часть остова и О-замещенная боковая цепь несущественны для жизнеспособности бактерий, благодаря чему были выделены мутанты (обозначенные на рис. 11.17 пунктирными линиями), у которых блокирован какой-либо один из последовательных этапов синтеза этих частей липополисахарида.

Липополисахариды — главные антигенные детерминанты клеточной стенки грамотрицательных бактерий, они служат также рецепторами для адсорбции многих бактериофагов. Поэтому липополисахариды должны быть расположены, частично или полностью, на наружной поверхности внешнего слоя стенки. Кроме того, показано, что длинные О-замещенные боковые цепи выступают наружу на расстояние около 30 нм от поверхности стенки.

Тонкая структура и толщина внешнего слоя стенки свидетельствуют о том, что, подобно клеточной мембране, этот слой, возможно, состоит из двойного слоя фосфолипидов, в который включены белки и липополисахариды. Схематическое изображение возможного строения внешнего слоя стенки (предполагается, что липополисахариды сосредоточены в его наружной части) приведено на рис. 11.18.

У энтеробактерий (и, вероятно, у других грамотрицательных бактерий) на внешней поверхности пептидогликанового слоя стенки расположены липопротейды особого типа. Молекулы этих липопротендов ковалентно соединены пептидной связью с некоторыми остатками диаминопимелиновой кисло-

Рис. 11.19. Схема, показывающая возможные связи между мембраной и клеточной стенкой у грамотрицательных бактерий. 1 — О-замещенная боковая цепь; 2 — остов; 3 — липид А; 4 — полярная голова; 5 — гидрофобная цепь жирной кислоты; 6 — липидная часть молекулы; 7 — ее белковая часть.



ты, входящей в пептидогликановую сеть. Они выступают наружу из этого слоя, причем наиболее удаленной от его поверхности оказывается липидная часть молекулы липопротеида. Таким образом, липопротеид служит мостиком между пептидогликановым слоем и внешним слоем стенки. Эта связь поддерживается благодаря гидрофобным взаимодействиям между липидной частью липопротеида и фосфолипидами внешнего слоя стенки. На рис. 11.19 приведена схема вероятных молекулярных взаимодействий между внешними слоями грамотрицательной клетки.

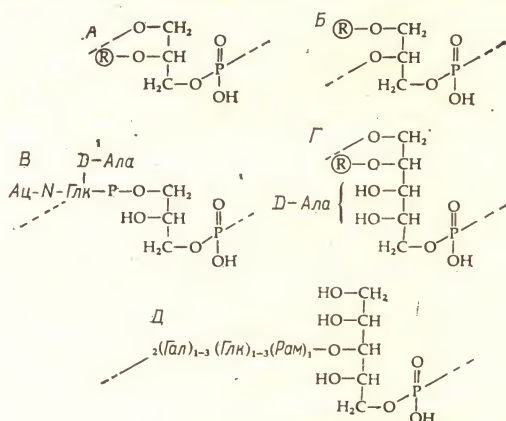
ПЕПТИДОГЛИКАН В СТЕНКАХ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

У большинства грамположительных бактерий пептидогликаны составляют от 40 до 90% сухой массы клеточной стенки. Такая стенка имеет однородную структуру и значительно толще (10—50 нм), чем слой пептидогликана в стенке грамотрицательных бактерий. Как уже упоминалось, у грамположительных бактерий существует значительное разнообразие структуры и состава пептидогликанов. Пептидогликановый матрикс стенки ковалентно связан с другими ее макромолекулярными компонентами, включая самые различные полисахариды и полимеры полифосфатов, которые называются *тейхоевыми кислотами*. Тейхоевые кислоты — это растворимые в воде полимеры, содержащие остатки глицерина или рибита, соединенные между собой фосфодиэфирными

Рис. 11.20. Повторяющиеся единицы некоторых тейхоевых кислот. А. Глицеринтейхоевая кислота из клеток *Lactobacillus casei* 7469 (R=D-аланин). Б. Глицеринтейхоевая кислота из клеток *Actinomyces*

antibioticus (R=D-аланин). В. Глицеринтейхоевая кислота из клеток *Staphylococcus lactis*, D-аланин находится в положении 6 N-ацетилглюкозамина. Г. Рибиттейхоевые кислоты из клеток *Bacillus subtilis* (R=глю-

коза) и *Actinomyces streptomycini* (R=сукцинат), D-аланин присоединен к 3- или 4-му углеродному атому рибита). Д. Рибиттейхоевая кислота из капсулы пневмококков типа 6.



связями (рис. 11.20). Надежных доказательств их точной локализации в клеточной оболочке пока не получено; в процессе фракционирования большая часть тейхоевой кислоты остается связанной с материалом клеточной стенки; показано также, что она соединена ковалентной связью с мурамовой кислотой. Однако небольшое количество тейхоевой кислоты (в основном глицеринтейхоевой) оказывается связанным с клеточной мембраной. Этот материал, называемый *мембранной тейхоевой кислотой* или *липотейхоевой кислотой*, ковалентно соединен с мембранными гликолипидами.

Тейхоевые кислоты являются главными поверхностными антигенами тех видов грамположительных бактерий, у которых они присутствуют, и их доступность для антител рассматривается как доказательство того, что они локализованы на внешней поверхности пептидогликанового слоя. Однако их активность часто повышается при неполном ферментативном гидролизе пептидогликана. Таким образом, можно полагать, что значительная часть тейхоевых кислот располагается между клеточной мембраной и слоем пептидогликана, выступая наружу через поры в последнем (рис. 11.21).

Повторяющиеся элементы некоторых тейхоевых кислот показаны на рис. 11.20. Этими элементами могут быть остатки глицерина, соединенные 1,3- и 1,2-связями, остатки рибита, соединенные 1,5-связями, или более сложные структуры, в которых глицерин или рибит соединены с остатками сахаров, таких, как глюкоза, галактоза или N-ацетилглюкозамин.

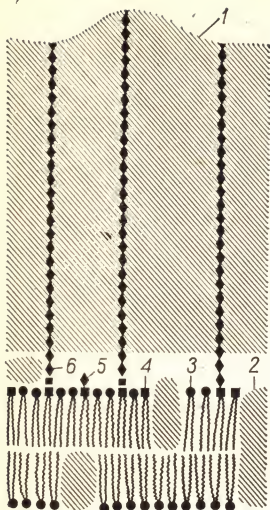


Рис. 11.21. Модель клеточной стенки и мембраны грамположительной бактерии, на которой показаны молекулы липотейхоевой кислоты, проходящие через клеточную стенку. Тейхоевые кислоты стенки, ковалентно связанные с остатками муравовой кислоты пептидогликанового слоя, на схеме не по-

казаны. 1 — клеточная стенка; 2 — белок; 3 — фосфолипид; 4 — гликолипид; 5 — фосфатидилгликолипид; 6 — липотейхоевая кислота. [Van Driel D. et al., Cellular location of the lipoteichoic acids of *Lactobacillus fermenti* NCTC 6991 and *Lactobacillus casei* NCTC 6375, J. Ultrastruct. Res., 43, 483 (1971).]

Цепи тейхоевых кислот могут быть длинными и содержать до 30 и более элементов, хотя часто встречаются цепочки, состоящие из 10 и даже меньшего числа элементов.

Большинство тейхоевых кислот содержит значительные количества D-аланина, присоединенного обычно либо к глицерину в положении 2 или 3, либо к рибиту в положении 3 или 4. Однако в некоторых, более сложных, тейхоевых кислотах D-аланин связан с одним из остатков сахаров. Кроме D-аланина к свободным гидроксильным группам глицерина и рибита могут присоединяться и другие заместители: глюкоза, галактоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин или сукцинат. У данного вида бактерий помимо D-аланина может встречаться несколько типов сахарных остатков; в таких случаях неясно, входят ли они в состав одной и той же или разных молекул тейхоевой кислоты.

Хотя функция тейхоевых кислот неизвестна, ясно, что они должны определенным образом влиять на проникновение ионов через внешние слои поверхности клетки, так как создают в ее оболочке высокую плотность регулярно ориентированных зарядов.

Стенки большинства грамположительных бактерий не содержат липидов, однако в составе коринебактерий, микобактерий и нокардий встречаются различные длинноцепочечные жирные кислоты, соединенные сложноэфирными связями с полисахаридами стенки. В стенках большинства грамположительных бактерий белки отсутствуют, а если и обнаруживаются, то в виде отдельного слоя, который располагается на внешней поверхности стенки и часто имеет весьма регулярное строение.

ФУНКЦИЯ ПЕПТИДОГЛИКАНОВОГО СЛОЯ

Хотя стенки прокариотических клеток различаются по своему химическому составу, в них почти всегда присутствует непрерывный слой пептидогликана, что указывает на функциональную важность этого специфического полимера стенки. Пептидогликановый слой в первую очередь, по-видимому, определяет форму клетки, а также противодействует тургорному давлению клеточного содержимого и, следовательно, предотвращает осмотический лизис клетки. Эти выводы подтверждаются данными о действии на бактерии агентов, нарушающих структуру пептидогликана или подавляющих его синтез. На стр. 88 уже рассматривался лизис бактерий, происходящий под действием лизоцима в результате гидролитического расщепления связи N-ацетилмурамил-N-ацетилглюкозамина в гликановых цепях, что приводит к нарушению целостности структуры пептидогликана. Летальное действие пенициллинов на растущие популяции прокариот, содержащих пептидогликаны, является следствием ингибирования этими антибиотиками конечного этапа синтеза пептидогликана — образования поперечных сшивок между пептидными цепями. Возникающее в результате разрыхление пептидогликановой сети приводит к осмотическому лизису растущих клеток.

В связи с этим следует остановиться на очень интересных свойствах *бактериальных L-форм*. В 1935 г. было обнаружено, что на богатой среде *Streptobacillus moniliformis* может давать атипичные колонии, в которых вместо нормальных палочковидных клеток присутствуют образования неправильной, часто глобулярной формы. Было установлено, что эти так называемые *L-формы* могут размножаться неопределенно долго на сложных, содержащих сыворотку средах. Сначала полагали, что *L-формы*, которые так не похожи по строению на *S. moniliformis*, представляют собой симбионты или паразиты этой бактерии, но такую интерпретацию пришлось отбросить, когда оказалось, что в редких случаях они могут ревертировать в палочковидные формы. Обнаружение в дальнейшем *L-форм* других бактерий показало, что это явление отнюдь не ограничено одним лишь видом — *S. moniliformis*.

После открытия пенициллина было найдено, что *L-формы устойчивы к пенициллину* и фактически могут быть отобраны путем культивирования бактерий на осмотически забуференной среде, содержащей пенициллин (рис. 11.22). Как правило, удаление из среды пенициллина после короткой инкубации бактерий в его присутствии ведет к немедленной реверсии клеток к нормальной форме. После длительных периодов выращивания бактерий в присутствии пенициллина некото-

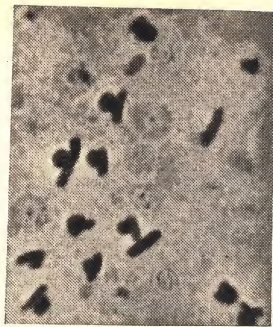


Рис. 11.22. Возникновение L-форм у *Proteus vulgaris*: превращение палочек в сферические тела в процессе роста в присутствии пенициллина (фазовый контраст, $\times 2000$).

(Фото предоставлено Е. Келленбергером и К. Либермейстером.)

рые из них продолжают расти в виде L-форм и в том случае, если пенициллин удален из среды. Наблюдаются различия как в длительности выдерживания бактерий с пенициллином, необходимой для сохранения L-форм в отсутствие этого антибиотика, так и в доле модифицируемой популяции. Кроме того, стабильность возникающих L-форм варьирует, даже если они получены из одного и того же вида бактерий; некоторые из них никогда не ревертируют («стабильные L-формы»), другие время от времени ревертируют («нестабильные L-формы»).

На основании того, что известно о способе действия пенициллина, L-формы можно рассматривать как бактерии с резким нарушением синтеза пептидогликанового слоя, у которых, однако, сохранилась способность расти, хотя и в необычной клеточной форме, в среде достаточно концентрированной, чтобы предотвратить их осмотический лизис.

В клетках некоторых стабильных L-форм компоненты пептидогликанового слоя полностью отсутствуют. Все нестабильные L-формы, так же как и некоторые стабильные, все еще содержат мурамовую кислоту, но в относительно низкой концентрации (соответствующей 10—15% ее содержания в нормальных клетках). Кроме того, эта мурамовая кислота находится в необычном химическом состоянии, поскольку легко экстрагируется разбавленной кислотой в отличие от мурамовой кислоты нормальных клеток. Приведенные факты дают общее представление о природе L-форм: *L-формы — это бактерии, у которых в результате действия пенициллина утрачена или изменена затравка для синтеза пептидогликана.* В первом случае включение пептидогликана в бактериальную стенку полностью прекращается, во втором — нарушается образование нормального непрерывного слоя пептидогликана, так как вновь синтезированные субъединицы включаются в стенку нерегулярным и некоординированным образом. В редких случаях L-формам последнего типа все же удается осуществить ресинтез непрерывного пептидогликанового слоя, после чего они ревертируют в нормальную бактериальную форму.

L-формы могут быть получены как из грамположительных, так и из грамтрицательных бактерий. У последних внешний слой клеточной стенки, по-видимому, продолжает синтезироваться нормальным образом; на это указывают как электронно-микроскопические исследования, так и тот факт, что подобные L-формы сохраняют О-антигены и остаются чувствительными к инфекции фагами, для которых в клетках имеются рецепторы, расположенные во внешнем слое стенки.

ФУНКЦИИ ВНЕШНЕГО СЛОЯ СТЕНКИ У ГРАМТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

У грамтрицательных бактерий пептидогликан составляет лишь незначительную часть компонентов стенки; количественно в ней преобладают белки, фосфолипиды и липополисахариды, входящие в состав внешнего слоя стенки.

Существует много указаний на то, что внешний слой стенки грамтрицательных бактерий является барьером, препятствующим проникновению в клетку некоторых веществ из окружающей среды. К этим веществам относится ряд антибиотиков, особенно пенициллины, к которым грамтрицательные организмы значительно менее чувствительны, чем грамположительные, хотя у обеих групп атакуемый пеницилинами фермент (транспептидаза) в изолированном состоянии ингибируется одинаковыми концентрациями антибиотиков. Кроме того, внешняя мембрана частично задерживает, по-видимому, краски и соли желчных кислот.

Можно полагать, что липополисахариды играют важную роль в этой функции внешнего слоя стенки, так как шероховатые мутанты, у которых липополисахарид стенки утратил О-замещенную цепь и часть олигосахаридного остова, намного чувствительнее к пенициллину и некоторым другим антибиотикам, чем штаммы дикого типа. Обработка грамтрицательных бактерий хелатобразующим агентом ЭДТА, который вызывает освобождение из клеточной стенки значительной части липополисахарида, также повышает чувствительность клеток ко многим антибиотикам.

Внешний слой стенки, несомненно, служит барьером и для белков. Как уже обсуждалось в гл. 10, многие ферменты, которые у грамположительных бактерий являются экзоферментами, у грамтрицательных локализованы в периплазме (отгорожены внешним слоем стенки).

Специфичность соматических антигенов грамтрицательных бактерий определяется главным образом липополисахаридом внешнего слоя клеточной стенки, а более конкретно — сахарами О-замещенных боковых цепей, выступающих наружу с поверхности стенки. Большинство грамтрицательных бактерий, выделенных из природных источников, принадлежит к «гладким» вариантам и содержит на своей поверхности

О-замещенные боковые цепи. Однако в чистых культурах происходит образование «шероховатых» мутантов, утративших О-замещенную боковую цепь липополисахарида; благодаря высокой частоте их появления они нередко вытесняют гладкий родительский штамм. Эти факты наводят на мысль, что в природных условиях сохранение «гладкого» состояния (и, следовательно, О-замещенной боковой цепи липополисахарида) дает бактериям заметные преимущества при отборе. В то же время в природных бактериальных популяциях существует огромное структурное разнообразие О-замещенных боковых цепей (а следовательно, и специфичности соматических антигенов). Например, у энтеробактерий группы *Salmonella* найдены сотни специфических серотипов, различающихся антигенной структурой О-замещенных боковых цепей, но в других отношениях фенотипически почти неразличимых.

Совершенно ясно, что для патогенных грамотрицательных бактерий, таких, как представители группы *Salmonella*, обладание О-замещенной боковой цепью имеет определенное селективное преимущество. Ее присутствие на поверхности клетки делает бактерию относительно устойчивой к захвату фагоцитами животного-хозяина, причем эта устойчивость теряется только в том случае, если хозяин синтезировал антитела, специфически направленные против О-замещенной боковой цепи. Поэтому антигенное разнообразие, обусловленное различной структурой О-замещенных боковых цепей липополисахарида, дает патогенным видам бактерий значительное преимущество при отборе, так как маловероятно, чтобы животное-хозяин имело высокий уровень антител, специфичных в отношении большого числа О-замещенных боковых цепей разных типов. При введении в кровоток животного липополисахариды проявляют высокую токсичность. Они вызывают лихорадку, а при высоких концентрациях — внутренние кровотечения и шок.

ТОПОЛОГИЯ СИНТЕЗА СТЕНКИ И МЕМБРАНЫ

В процессе клеточного цикла бактерии поверхностные слои клетки непрерывно меняют свою форму. Увеличение объема клетки сопровождается возрастанием площади как стенки, так и мембраны. С момента начала деления в клеточной стенке происходят векторные изменения: начинается образование поперечной перегородки, которая растет внутрь клетки под прямым углом к клеточной стенке до тех пор, пока не образуется законченная перегородка, разделяющая два дочерних протопласта. Вслед за этим поперечная перегородка разделяется на два слоя, каждый из которых становится полюсом одной из образовавшихся дочерних клеток.

110 Как показывают результаты опытов по фракционированию клетки, конечные этапы синтеза фосфолипидов и моно-

меров, предназначенных для включения в основные полимеры стенки, осуществляются ферментами, локализованными в клеточной мембране. Однако не известно, концентрируются ли эти ферменты в определенных участках мембраны, или они более или менее равномерно распределены по всей ее поверхности.

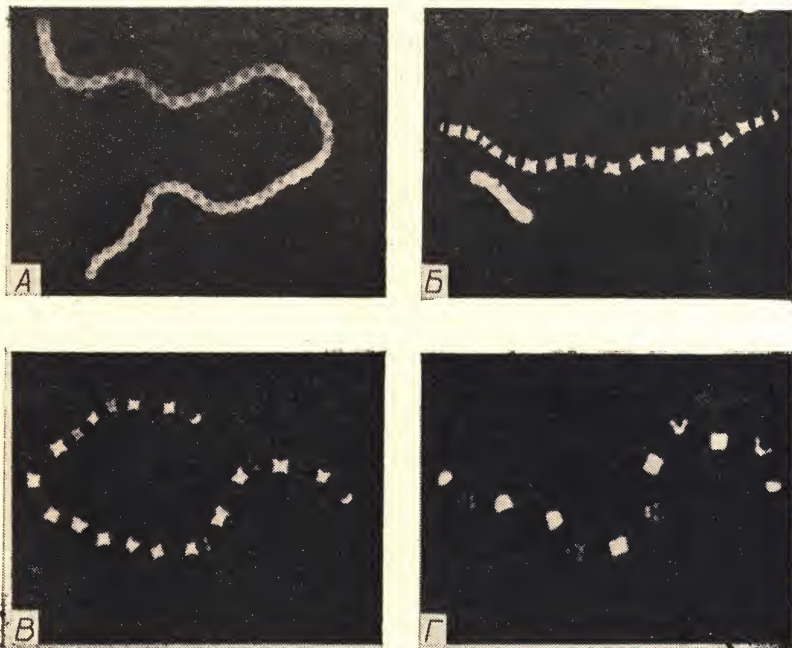
Увеличение поверхности стенки и мембраны, сопровождающее рост клетки, могло бы происходить путем включения нового материала в особые точки роста или путем его внедрения во многие места предсуществующего матрикса стенки и мембраны. Для выяснения этого вопроса были проведены многочисленные эксперименты, часто дававшие противоречивые результаты. Важно учитывать, что в процессе роста клетки может происходить вторичное перераспределение вновь включенного материала. Например, пластичность клеточной мембраны и внешнего слоя стенки прамитрицательных бактерий может привести к тому, что распределение вновь синтезированных компонентов будет казаться случайным даже в том случае, если первичное включение происходило в специфических точках. Аналогичный результат получился бы и вследствие быстрого обновления компонентов стенки или мембраны. Таким образом, доказательства локального роста стенки или мембраны являются неоспоримыми, тогда как данные в пользу случайного включения часто бывают сомнительными.

Для стрептококков (грамположительных бактерий со сферическими клетками) было получено четкое доказательство локализации роста стенки в экваториальной области в опытах с использованием специфической антисыворотки против компонентов стенки. Антисыворотка, соединенная с флуоресцентным красителем, связывалась с поверхностью клеток, и последняя интенсивно и равномерно флуоресцировала. В процессе последующего роста в присутствии нефлуоресцирующей антисыворотки полюса клеток продолжали интенсивно флуоресцировать в течение нескольких генераций, а новая, нефлуоресцирующая поверхность стенки постепенно встраивалась по мере роста между старым ее материалом (рис. 11.23). Таким образом, во время экспоненциального роста стрептококков синтез стенки строго локализован и, однажды образовавшись, стенки вторично не модифицируются. Но было также показано, что в том случае, если рост стрептококков прекращается в результате ингибирования синтеза белка (например, при недостатке какой-либо необходимой аминокислоты или под действием хлорамфеникола), синтез материала стенки продолжается и выражается в постепенном утолщении стенки по всей ее поверхности (рис. 11.24). Следовательно, в этих условиях предшественники стенки должны включаться во многих точках. При использовании в качестве метки флуоресцирующих антител в

Рис. 11.23. Рост клеточной стенки *Streptococcus pyogenes*, прослеженный с помощью микрофотографирования в ультрафиолетовом излучении растущих цепочек клеток, у которых клеточная стенка предварительно была покрыта флуоресцирующим анти-

телом. А. Сразу после обработки антителом; клетки флуоресцируют равномерно. Б. После выращивания в течение 15 мин. На экваторе каждой клетки образовался новый (нефлуоресцирующий) материал стенки; полюса клеток, меченные флуоресциру-

ющим антителом, продолжают флуоресцировать. В и Г. Вид цепочек клеток через 30 и 60 мин выращивания соответственно. [Cole R. M., Hahn J. J., Cell replication in *Streptococcus pyogenes*, Science, 135, 722 (1962).]



опытах с грамотрицательными бактериями не было получено указаний на локальный рост стенки; по мере роста интенсивность флуоресценции клеток ослабевала равномерно и постепенно. Однако применявшиеся в этих опытах антитела были специфичны в отношении компонентов внешнего слоя стенки (главным образом липополисахаридов), которые могли перераспределяться благодаря пластичности двойного липидного слоя. Особый случай строго локализованного роста как стенки, так и мембраны был обнаружен у грамотрицательного организма — *Caulobacter*. В каждой генерации клеток на полюсе дочерней клетки-швермера, где первоначально был расположен жгутик, развивается характерная для каулобактеров нитевидная простека (см. гл. 5), достигающая в норме длины 2—3 мкм. Однако в условиях, когда клетки испытывают недостаток в неорганическом фос-

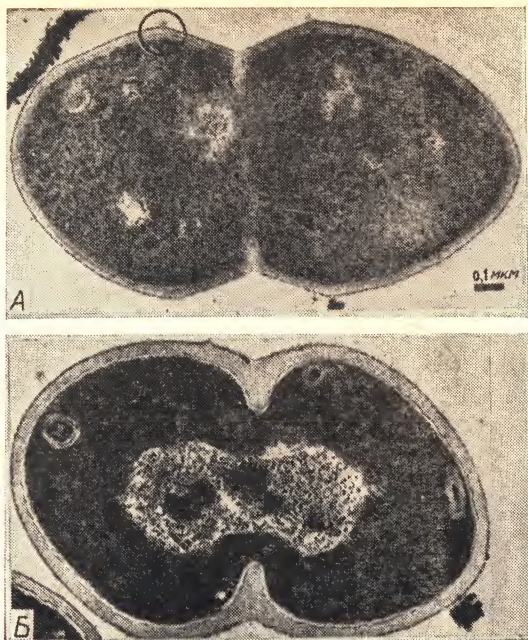


Рис. 11.24. Электронные микрофотографии ультратонких срезов клетки *Streptococcus faecalis*, показывающие способ роста стенки. А. Продольный срез делящейся клетки; в кружок заключен один из стеночных валликов, отделяющий новосинтезированную экваториальную стенку от стенки, синтезированной в предыдущей генерации. Стрелка указывает на мезосому перегородки. Б. Срез клетки, которая в течение 20 ч была лишена необходимой аминокислоты (треонина), в результате чего синтез белка прекратился, но образование стенки продолжалось. Заметно значительное утолщение стенки по сравнению с А. [Higgins M. L., Shockman G. D., Early changes in the ultrastructure of *Streptococcus faecalis* after amino acid starvation, J. Bact., 103, 246 (1970).]

фате, удлинение простеки продолжается и эта структура достигает длины 10—15 мкм. В клетки-швермеры можно ввести равномерную радиоактивную метку путем выращивания их в присутствии меченой тритием глюкозы. Если затем перенести эти клетки в среду, содержащую нерадиоактивную глюкозу и ограниченное количество фосфата, то первоначально образовавшиеся в присутствии меченой глюкозы короткие простеки начинают удлиняться. Последующая радиоавтография таких клеток показывает, что радиоактивный материал обнаруживается в теле клетки и на дистальном конце простеки, а ее проксимальный участок оказывается нерадиоактивным (рис. 11.25). Это означает, что удлинение простеки происходит путем строго локализованного синтеза на проксимальном конце, т. е. в том месте, где она непосредственно присоединяется к телу клетки. Поскольку простека состоит из мембранной сердцевины, окруженной как внутренним, так и внешним слоями стенки, очевидно, что в данном случае синтез *всех* этих структурных элементов является локализованным.

113 В свете данных о многообразных функциях клеточной мембраны, особенно о ее предполагаемом участии в сепрегации

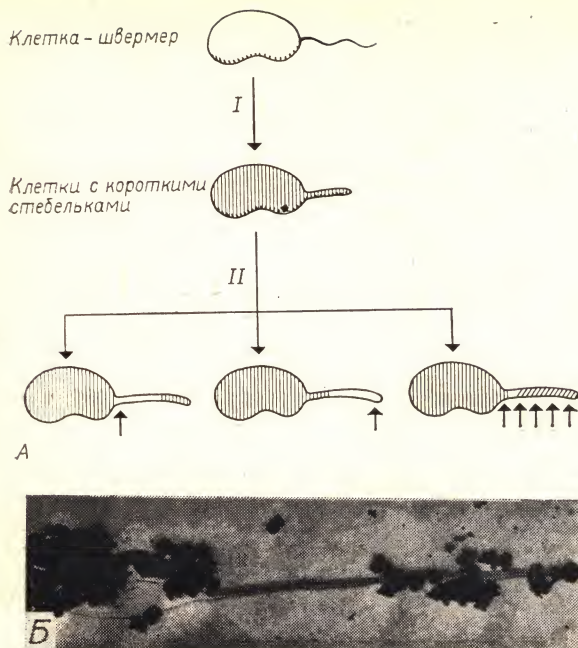


Рис. 11.25. А. Схема возможного распределения метки в стебельковых клетках *Caulobacter* при проведении эксперимента, описанного в тексте. I — выращивание клеток в присутствии ^3H -глюкозы; II — выращивание клеток с ограниченным количеством фосфата. Заштрихованные участки означают образовавшиеся в клетке радиоактивные области; стрелки показывают соответствующие места удлинения простеки. Б. Радиоавтограф клетки с удлинившейся простекой. [Schmidt J., Stanier R. Y., The development of cellular stalks in caulobacteria, J. Cell Biol., 28, 423 (1966).]

бактериального генома, топология мембранного роста представляет особый интерес. Проведены многочисленные исследования роста мембраны с использованием меченных радиоактивными или тяжелыми изотопами предшественников мембранных липидов, таких, как глицерин или жирные кислоты. Эти исследования не доказали, что синтез мембраны является локализованным. Однако результаты, полученные в недавних опытах с применением в качестве маркеров мембранного роста некоторых индуцибельных мембранных белков, свидетельствуют о том, что на самом деле рост мембраны строго локализован. У *E. coli* синтез β -галактозидпермеазы, находящейся в мембране, контролируется лактозным опероном; в мембране полностью индуцированных клеток содержится приблизительно 10^4 молекул пермеазы. Так как пермеаза необходима для поглощения лактозы, в среде, содержащей этот сахар, могут расти только индуцированные клетки. Когда смесь индуцированных и неиндуцированных клеток подвергают действию пенициллина в присутствии лактозы, используемой в качестве единственного источника углерода, индуцированные клетки сразу же начинают расти и подвергаются быстрому лизису в результате нарушения синтеза стенки. Неиндуцированные клетки лизируются несколько позднее, после того как начнется синтез пермеазы, индуцированный лактозой. Следовательно, этим методом можно

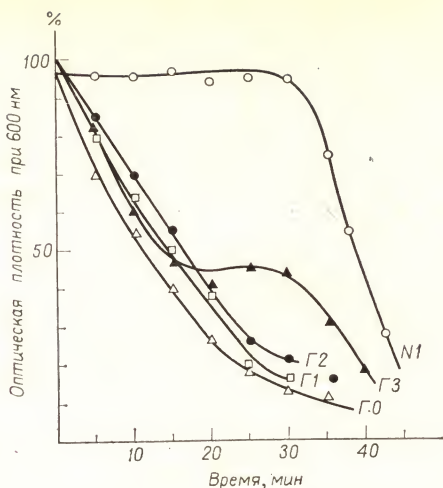


Рис. 11.26. Динамика лизиса клеток *E. coli*, вызванного пенициллином. Г0 — клетки с полностью индуцированным синтезом галактозидпермеазы, Г1, Г2 и Г3 — клетки после выращивания соответственно в течение одной, двух и трех генераций в отсутствие индуктора. Кривая N1 показывает динамику лизиса неиндуцированной контрольной популяции. [Képès A., Autissier F., Topology of membrane growth in bacteria, Biochem. Biophys. Acta, 265, 443 (1972).]

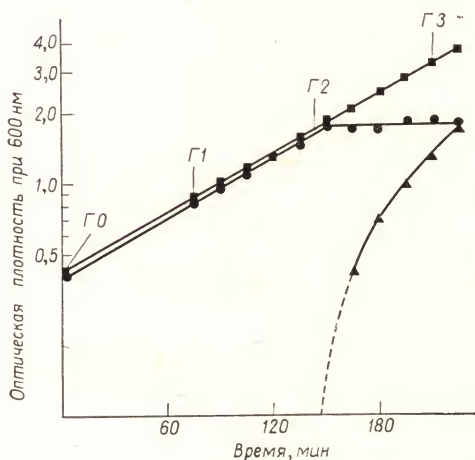


Рис. 11.27. Кинетика сегрегации β -галактозидпермеазы по данным эксперимента, аналогичного представленному на рис. 11.26; ■ — общая оптическая плотность популяции; ● — оптическая плотность после 30 мин воздействия пенициллина (пермеазоотрицательная популяция); ▲ — оптическая плотность пермеазоположительной популяции (вычисленная по разности). [Képès A., Autissier F., Topology of membrane growth in bacteria, Biochem. Biophys. Acta, 265, 443 (1972).]

определить гетерогенность клеточной популяции в отношении пермеазной функции.

Если полностью индуцированную популяцию *E. coli* перенести на среду без индуктора (например, с глицерином в качестве источника углерода), то все клетки популяции в течение двух генераций сохраняют способность к быстрому лизису под действием пенициллина в присутствии лактозы. Однако к третьей генерации только половина популяции подвергается немедленному лизису (рис. 11.26). Таким образом, между второй и третьей генерациями значительная часть клеточной популяции внезапно становится пермеазоотрицательной (рис. 11.27). Исходя из предположения о том, что

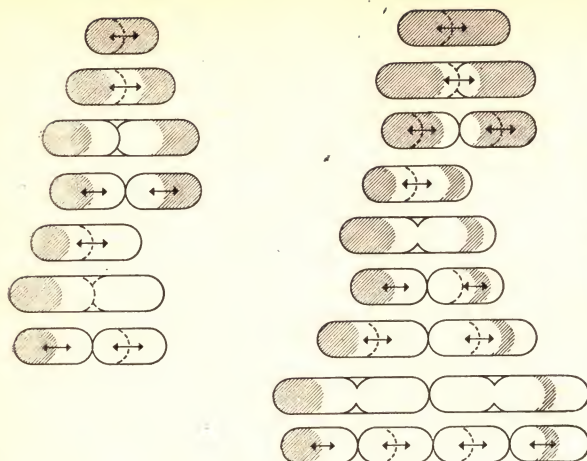


Рис. 11.28. Распределение родительской мембраны (заштрихованная область) среди потомков бактерии с единственной зоной роста, расположенной посредине клетки. Стрелка показывает направление роста новой мембраны. Слева — только что поделившаяся клетка; справа — клетка на половине интервала между двумя делениями. [Képès A., Autissier F., Topology of membrane growth in bacteria, Biochem. Biophys. Acta, 265, 443 (1972).]

синтез мембраны у *E. coli* происходит в центральной зоне, разделяющей в процессе роста два «старых» мембранных полюса, можно было бы ожидать, что через две клеточные генерации, считая от только что поделившейся клетки, половина популяции не будет содержать «старой» мембраны. Однако в экспоненциально растущих популяциях содержатся клетки на всех стадиях цикла роста. Если проследить за судьбой клетки, находящейся на полпути между двумя делениями, рассматривая ее как пример такой несинхронизированной популяции, то окажется, что она дает потомков, не содержащих «старой» мембраны, только после третьего деления, т. е. через 2,5 генерации. Эти две ситуации схематически изображены на рис. 11.28. Таким образом, тот факт, что пермеазоотрицательные клетки начинают появляться только между второй и третьей генерациями, считая с момента удаления индуктора, полностью согласуется с гипотезой о том, что включение вновь синтезированного материала в растущую мембрану происходит в центральной части клетки. Эти наблюдения можно было бы столь же удовлетворительно объяснить, допустив, что мембрана растет в каком-то другом локальном центре (например, на полюсах клетки), но они совершенно несовместимы с моделями, предполагающими включение материала во многих точках мембранной поверхности.

КАПСУЛЫ И СЛИЗИСТЫЕ СЛОИ

Многие прокариоты синтезируют органические полимеры, которые откладываются с наружной стороны клеточной стенки в виде рыхлого, более или менее аморфного слоя, называемого *капсулой* или *слизистым слоем*. Термином «капсула» обычно обозначают слой, который сохраняет связь с

клеточной стенкой и служит внешним покровом клетки. Он имеет ограниченную толщину и четко выявляется под микроскопом после негативного окрашивания. Часто, однако, эти *экзополимеры* образуют значительно более обширные скопления, частично отделившиеся от образовавших их клеток. Эти различия в локализации и толщине слоев обусловлены главным образом количеством образующегося полимера и его растворимостью в воде. Несомненно, такой слой не является существенно важным для функционирования клетки: у многих бактерий он вообще не образуется, а те бактерии, которые в норме образуют его, могут терять эту способность в результате мутации, что никак не сказывается на их росте.

Экзополимеры сильно различаются по составу. Несколько видов *Bacillus* образуют экзополипептиды, построенные только из одной глутаминовой кислоты преимущественно D-конфигурации. Глутамидные остатки связаны между собой посредством γ -карбоксильной группы так же, как в боковой цепи пептидогликанов. Все остальные бактериальные экзополимеры являются полисахаридами (табл. 11.2). Исходя из механизма их биосинтеза, полисахариды делят на два основных класса. Большинство из них синтезируется из сахаронуклеотидных предшественников (например, из УДФ-глюкозы, УДФ-галактозы, ГДФ-фукозы и ГДФ-маннозы). Образование полисахаридной цепи состоит из последовательного переноса гликозильных остатков, осуществляемого, вероятно, при помощи липидного переносчика клеточной мембраны, хотя это было показано лишь в немногих случаях. Таким образом, биохимические механизмы синтеза этого класса экзополисахаридов очень сходны с механизмами, участвующими в образовании гликановых цепей пептидогликанов (см. гл. 7) и полисахаридной части липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Сахара, входящие в этот класс экзополисахаридов, синтезируются клеткой в процессе нормального промежуточного метаболизма. Поэтому природа доступных питательных веществ мало или вообще не влияет на их биосинтез. Такие полисахариды отличаются большим разнообразием входящих в их состав моносахаридов, аминокислот и урсонных кислот, причем некоторые из составляющих их сахаров могут содержать ацетильные группы или остатки пировиноградной кислоты. Детальная структура выяснена, за редкими исключениями, лишь для нескольких простейших гомополимерных экзополисахаридов (например, для целлюлозы, синтезируемой *Acetobacter xylinum*).

Два типа экзополисахаридов — *декстраны* и *леваны* — имеют другую биосинтетическую природу: они образуются непосредственно из экзогенного субстрата — дисахарида сахарозы путем последовательного присоединения гликозильных единиц к акцепторной молекуле сахарозы. Обозначив

ТАБЛИЦА 11.2
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭКЗОПОЛИМЕРЫ

Полимер	Субъединицы	Структура (если известна)	Организмы
Полиглютамин- новая кисло- та	Глутаминовая кис- лота (главным образом D-изо- мер)	А. Экзополипеп- тиды -γ-глутамил-γ- глутамил- Б. Экзополисаха- риды, синтези- руемые из са- харонуклеоти- дов	<i>Bacillus anthra- cis</i> <i>B. megaterium</i>
Целлюлоза	Глюкоза	-β-глюкозил- (1→4)-β-глюко- зил-	<i>Acetobacter xy- linum</i>
Глюкан	»	-β-глюкозил- (1→2)-β-глюко- зил-	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Энтеробактерии
Колановая кис- лота	Глюкоза, галакто- за, фукоза, глю- куроновая кисло- та, пировино- градная кислота		
Полиурониды	Маннуриновая кислота, глюку- риновая кислота		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vi- nelandii</i>
Полисахариды пневмококков			
Тип II	Глюкоза, рамноза, глюкуроновая кислота		
Тип III	Глюкоза, глюкуро- новая кислота	-(-3-β-глюкуро- нил-(1→4)-β- глюкозил)-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Тип XIX	Глюкоза, рамноза, N-ацетил-D-ман- нозамин, фосфат		
Тип XXXIV	Глюкоза, галакто- за, рибит, фос- фат		
		Б. Экзополисаха- риды, синтези- руемые из саха- розы	
Декстраны	Глюкоза (фрукто- за)	-α-фруктозил-β- глюкозил- (1→6)-β-глю- козил-	<i>Leuconostoc</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.
Леваны	Фруктоза (глюко- за)	-β-глюкозил-α- фруктозил- (2→6)-α-фрук- тозил-	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Xanthomonas</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i>

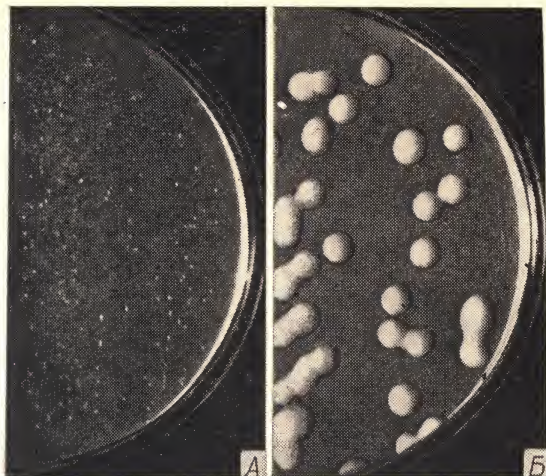
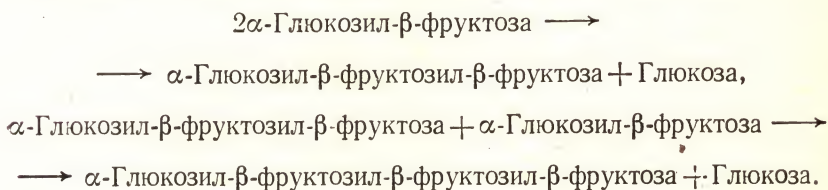


Рис. 11.29. Образование внеклеточных полисахаридов клетками *Leucanostoc mesenteroides*. А. Среда с глюкозой. Б. Среда с сахарозой. Большой размер и слизистый вид колоний на среде с сахарозой вызван интенсивным синтезом декстрана и его отложением вокруг клеток.

молекулу сахарозы как α -глюкозил- β -фруктоза, можно дать следующую схему начальных этапов синтеза левана:



Таким образом, в молекуле левана к терминальному глюкозильному остатку присоединена посредством (2 \rightarrow 6)-связи цепочка β -фруктозильных остатков. Синтез декстранов происходит аналогичным образом путем последовательного присоединения α -глюкозильных единиц к остатку фруктозы акцепторной молекулы сахарозы. Поэтому декстраны содержат концевой β -фруктозильный остаток.

Образование декстранов и леванов, происходящее без затраты АТФ, необходимого для синтеза сахаронуклеотидных предшественников, возможно благодаря сохранению энергии гликозидной связи в дисахариде, используемом в качестве субстрата. Удлинение цепи осуществляется в результате трансгликозилирования. По этой причине декстраны и леваны не могут синтезироваться из свободных моносахаридов; специфическим субстратом для их синтеза служит сахароза. Вследствие этого бактерии, образующие декстраны и леваны, синтезируют эти капсульные вещества только на средах, содержащих сахарозу. Колонии таких организмов, выращенные в присутствии сахарозы, выглядят совершенно иначе, чем их колонии, выращенные в присутствии глюкозы

	Жгутики (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Пили типа I (<i>Escherichia coli</i>)
Форма органеллы	Спиральная нить диаметром 14 нм	Прямая нить диаметром 7 нм
Белковая субъединица	Флагеллин (молекулярный вес 40000)	Пилин (молекулярный вес 17000)

Предполагаемая модель
сборки субъединиц
(масштаб не выдержан)

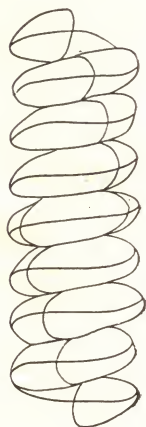
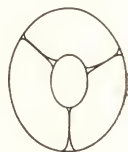
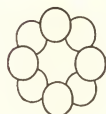


Рис. 11.30. Модели, показывающие предполагаемое спиральное расположение белковых субъединиц в бактериальных жгутиках (слева) и пилиях (справа).



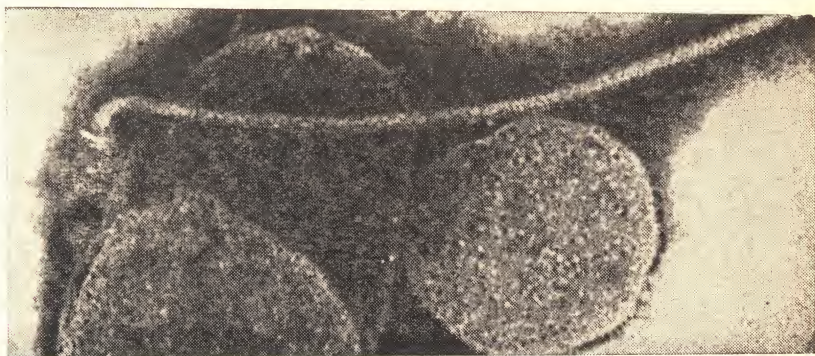
МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ЖГУТИКОВ И ПИЛЕЙ

Два класса нитевидных поверхностных придатков бактерий — жгутики и пили — объединяет много общих структурных особенностей, хотя они различаются как по функции, так и по внешней форме. И те и другие происходят из клеточной мембраны и выступают наружу, пройдя через клеточную стенку. Их длина может превышать диаметр клетки почти в 10 раз. Наружную часть этих органелл можно отделить от клетки механическими способами (например, под действием гидродинамических сил в гомогенизаторе) и в дальнейшем выделить и очистить. Нити жгутиков и пилей состоят из особых белков, называемых *флагеллинами* и *пилинами*. При воздействии нагреванием или кислотой на вы-

Рис. 11.31. Электронная микрофотография негативно окрашенного лизата пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum* (×181 000). Видна базальная структура

изоллированного жгутика, состоящая из базального крючка и присоединенных к нему парных дисков. Другие, видимые в поле зрения объекты — фрагменты

мембранной фотосинтезирующей системы. [Cohen-Bazire G., London J., Basal organelles of bacterial flagella, J. Bact., 94, 458 (1967).]



деленные жгутики или пили можно получить белковые субъединицы (мономеры), которые имеют относительно небольшой мол. вес (от 17 000 до 40 000). Изучение выделенных жгутиков и пилей с помощью электронного микроскопа и методом дифракции рентгеновских лучей показало, что белковые мономеры собраны в спиральные цепи, закрученные вокруг полой сердцевины. Отсюда следует, что строение нити зависит от свойств составляющих ее белковых субъединиц и определяется размером субъединиц, числом собранных из них цепей, а также величиной шага спиралей. Жгутики разных бактерий несколько различаются по диаметру (от 12 до 18 нм) и по форме (т. е. по высоте и шагу спирали нити). Пили разных типов заметно различаются по ширине (от 4 до 35 нм). Такая незначительная изменчивость в пределах каждого класса органелл, очевидно, отражает различия в свойствах отдельных флагеллинов и пилинов, обуславливающих их способность к агрегации. Показано, что единичная мутационная замена в аминокислотной последовательности флагеллина может приводить к изменению высоты и длины волны спирали образующегося из него жгутика.

На рис. 11.30 схематически изображена предполагаемая ультраструктура довольно подробно изученных нитей двух видов: жгутиков *Salmonella typhimurium* и пилей типа I *Escherichia coli*.

БАЗАЛЬНАЯ СТРУКТУРА ЖГУТИКА

При удалении жгутиков и пилей под действием гидродинамических сил эти органеллы разрываются вблизи клеточной поверхности, следовательно, их базальные структуры при

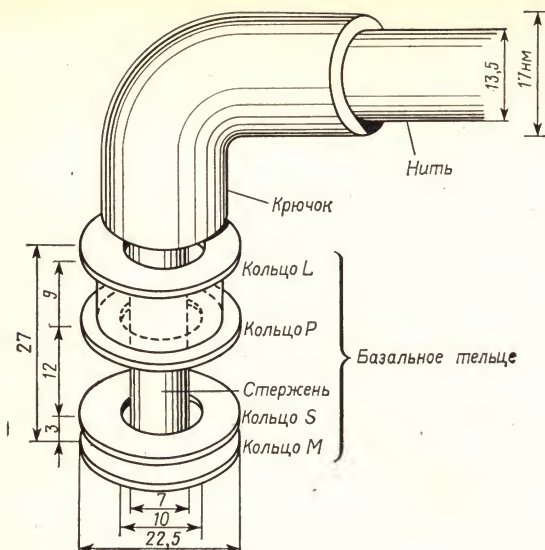


Рис. 11.32. Схематическая модель базального конца жгутика *E. coli*, основанная на электронных микрофотографиях выделенной органеллы. [De Pamphilis M. L., Adler J., Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, J. Bact., 105, 384 (1971).]

этом не обнаруживаются. Однако использование более мягких методов разрушения клеток (осмотического лизиса, обработки детергентами) позволяет выделить жгутики вместе с их интактными базальными структурами.

Полный жгутиковый аппарат состоит из трех отдельных участков. Самый внешний участок — спиральная жгутиковая нить постоянной толщины — построен из флагеллина. Вблизи клеточной поверхности нить присоединена к несколько более широкому участку, так называемому *крючку*. Он имеет длину около 45 нм и состоит из какого-то другого вида белка. Крючок в свою очередь соединен с *базальным тельцем*, полностью локализованным внутри клеточной оболочки (рис. 11.31).

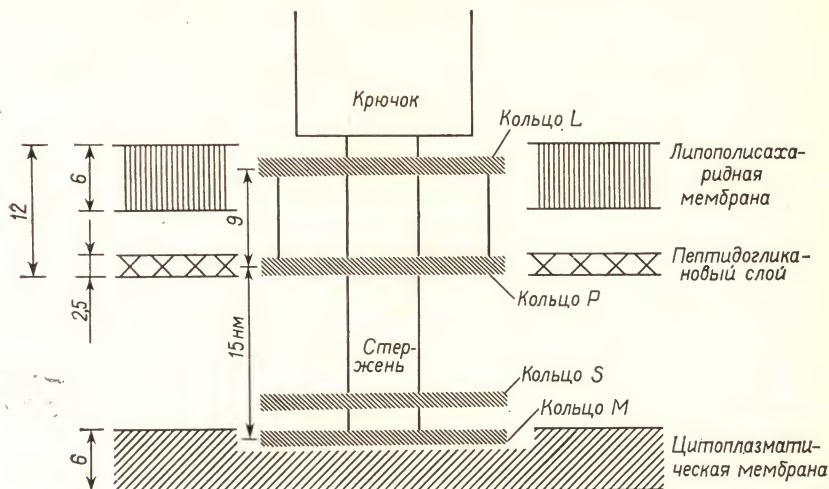
Базальное тельце состоит из небольшого центрального стержня, вставленного в систему колец. У грамотрицательных бактерий базальное тельце имеет две пары колец (рис. 11.32). Внешняя пара (кольца L и P) размещена на уровне внешнего и внутреннего слоев стенки соответственно; их функция, по-видимому, заключается в том, что они служат втулкой для стержня, проходящего через оба эти слоя стенки. Внутренняя пара (кольца S и M) локализована на уровне клеточной мембраны: кольцо M либо погружено в нее, либо находится непосредственно под ней, тогда как кольцо S лежит чуть выше, примыкая, вероятно, к внутренней поверхности пептидогликанового слоя (рис. 11.33).

На жгутиках грамположительных бактерий имеются только нижние (S и M) кольца; очевидно, верхняя пара не является необходимой для укрепления стержня, так как он про-

Рис. 11.33. Модель, показывающая предполагаемые пространственные связи между базальной

структурой жгутика и внешними слоями клетки *E. coli*. Размеры даны в нанометрах. [De Pamp

philis M L., Adler J., Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope, J. Bact., 105, 396 (1971).]



ходит через относительно толстую и помогенную грамположительную стенку. Это различие существенно, поскольку оно означает, что для функционирования жгутика достаточно только колец S и M.

СИНТЕЗ ЖГУТИКОВОЙ НИТИ

При соответствующих физико-химических условиях мономеры флагеллина могут реагировать в опытах *in vitro* с образованием нитей, по своему внешнему виду сходных со жгутиками, из которых эти мономеры были получены. Такой процесс сборки требует присутствия затравочных структур: коротких фрагментов жгутика, к которым могут присоединиться молекулы флагеллина. Подобные фрагменты обнаруживают структурную полярность; с помощью электронной микроскопии было показано, что один конец у них закруглен, а другой имеет выемку. Если затравочные фрагменты пометить антителами против жгутиков, то можно показать, что субъединицы флагеллина присоединяются только к концу с выемкой (рис. 11.34). Для того чтобы выяснить, какому концу интактного жгутика, присоединенного к бактериальной клетке, соответствует зазубренный конец фрагмента, был поставлен остроумный эксперимент по изучению роста жгутиков в клетках *Salmonella typhimurium*. Добавление к ростовой среде аминокислотного аналога *n*-фторфенилаланина приводит к тому, что клетки *S. typhimurium* начинают

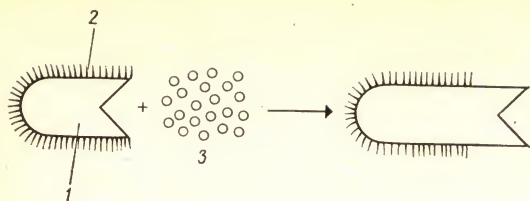


Рис. 11.34. Схема эксперимента, демонстрирующего одновекторный рост *in vitro* бактериального жгутика. 1 — срезанный фрагмент жгутика, покрытый антителами против жгутиков (2); 3 — субъединицы флагеллина.

синтезировать необычные («курчавые»). жгутики с меньшим шагом спирали, чем в норме. Если нормальные клетки культивируют в течение 2—3 ч в присутствии этого аналога, а затем проверяют распределение «курчавости» в их жгутиках, то оказывается, что она всегда обнаруживается на дистальном конце жгутика, тогда как его базальные части сохраняют обычный шаг спирали. Отсюда следует, что удлинение нити жгутика происходит путем присоединения новых субъединиц флагеллина к ее верхушке. Маловероятно, чтобы субъединицы присоединялись к верхушке растущего жгутика после их выделения из клетки и перемещения через среду. Скорее всего они синтезируются у основания жгутика и передвигаются к месту включения через его полую сердцевину.

МЕХАНИЗМ ДВИЖЕНИЯ ЖГУТИКОВ

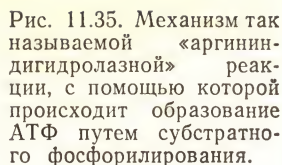
Роль жгутиков как органов движения бактерий можно продемонстрировать в очень простом эксперименте. Если жгутики механически отделить от клеток, то последние становятся неподвижными. Рост жгутиков быстро возобновляется, причем их нормальное число и длина восстанавливаются приблизительно за одну генерацию. В процессе роста жгутиков клетки сначала обнаруживают лишь вращательное движение; поступательное движение начинается после того, как жгутики достигнут некой критической длины.

В течение многих десятилетий обсуждался вопрос о способе, посредством которого бактериальные жгутики приводят клетку в движение, однако лишь недавно были получены экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу существования специального механизма. Эти данные, рассмотренные ниже, показывают, что жгутики представляют собой полужесткие спиральные роторы, каждый из которых вращается вокруг своей длинной оси по часовой стрелке или против нее. Движение органелле сообщает через ее основание жгутиковый «мотор». Предполагается, что он действует благодаря вращению колец S и M относительно друг друга. Как уже говорилось, кольцо M располагается внутри клеточной мембраны или непосредственно под ней. Необходимо, чтобы кольцо S также было закреплено в структур-

ном материале, только в этом случае возможно передвижение клетки за счет вращения двух колец относительно друг друга. По всей вероятности, кольцо S соединено с внутренней поверхностью клеточной стенки. Наличие такой связи могло бы объяснить неподвижность протопластов при сохранении у них интактных жгутиков после полного удаления лизоцимом бактериальной клеточной стенки.

Данные в пользу предложенного механизма получены в экспериментах с мутантами *E. coli*, утратившими способность к плавательному движению в результате образования у них структурно аномальных жгутиков. У мутантов одного типа возникают прямые жгутиковые нити, мутанты другого типа вообще не образуют нитей, а их жгутики построены из целого ряда крючков, длина которых составляет 1—2 мкм. При обработке мутантов антисывороткой против их аномальных жгутиков образуются хлопья, состоящие из клеток, которые связаны друг с другом благодаря комплексам, формирующимся между антителами и соответствующими жгутиками. Такие связанные клетки вращаются вокруг точки их соединения со скоростями от 2 до 9 оборотов в секунду. Вращающаяся клетка может модулировать свое движение тремя способами: путем непрерывного вращения в одном направлении (например, по часовой стрелке), путем остановки и последующего возобновления вращения в том же направлении и, наконец, путем изменения направления вращения (например, против часовой стрелки). Хотя эти наблюдения касаются вращения клетки, подразумевается, что одновременно вращаются и жгутики. В случае мутантов с прямыми жгутиками вращение жгутика было показано прямым способом при использовании небольших шариков из латекса, покрытых антителами, специфичными по отношению к жгутикам. Некоторые из таких шариков, добавленных в суспензию неподвижных клеток, присоединялись к жгутикам на расстоянии 1—2 мкм от поверхности клетки, при этом было видно, что они очень быстро вращаются.

Эти наблюдения наводят на мысль, что крючок жгутика приводится во вращение расположенным под ним мотором, после чего движение передается жгутиковой нити. По-видимому, клетка обладает способностью изменять как скорость, так и направление вращения, а также частоту остановок и пусков. Бактерии с перитрихальным жгутикованием перемещаются на небольшие расстояния по прямым линиям, причем это движение периодически прерывается внезапными и случайными изменениями направления пути — так называемыми *кувырканиями*. Недавние наблюдения показали, что спокойное плавание клеток в фиксированном направлении осуществляется путем равномерного вращения жгутиков против часовой стрелки (если смотреть на жгутик вдоль его оси вращения по направлению к клетке). Кувыркания про-



Политрихальные полярные пучки жгутиков у спироил имеют достаточную толщину, чтобы различить их при фазово-контрастном микроскопировании. Во время спокойного плавания клетки оба полярных пучка жгутиков вращаются в одинаковом направлении. Спироилы никогда не кувыркаются; перемена в направлении движения достигается реверсией вращения пучка жгутиков, что приводит к изменению направления пути точно на 180° . Механохимическая основа работы жгутикового мотора не известна. Однако существует много данных, указывающих на то, что эта работа зависит прямо (или, что более вероятно, косвенно) от непрерывной генерации клеткой АТФ¹. Подобно другим подвижным бактериям, являющимся облигатными аэробами, флуоресцирующие псевдомонады становятся неподвижными сразу же, как только запас кислорода во влажном препарате оказывается исчерпанным. Однако подвижность флуоресцирующих псевдомонад может поддерживаться и после исчерпания кислорода, если их обеспечить аминокислотой L-аргинином. Клетки, подвижность которых индуцирована аргинином в анаэробных условиях, двигаются медленнее, чем клетки, находящиеся в аэробных условиях. Их подвижность восстанавливается через несколько секунд после того, как они перестали двигаться вследствие истощения запасов кислорода. Такая индуцированная подвижность обусловлена способностью флуоресцирующих псевдомонад катализировать неокислительное превращение аргинина в орнитин, сопровождаемое синтезом АТФ (рис. 11.35).

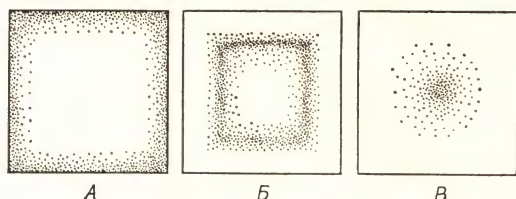
В суспензии жгутиковых бактерий клетки находятся обычно в состоянии непрерывного, но хаотического движения. Однако при создании в популяции бактерий градиентов неко-

126

Рис. 11.36. Реакции аэротаксиса у подвижных бактерий (по Бейеринку). Суспензии различных бактерий были помещены на предметные стекла и накрыты по-

кровными стеклами. А. Аэробные бактерии скапливаются вблизи краев покровного стекла, где концентрация кислорода наибольшая. Б. Микроаэрофильные бактерии

сосредотачиваются на некотором расстоянии от края. В. облигатные анаэробы собираются в центральной зоне, почти лишенной кислорода.



торых химических веществ клетки мигрируют и скапливаются в той части градиента, в которой концентрация данного вещества оказывается для них оптимальной. Некоторые вещества, вызывающие ответную реакцию клеток (главным образом пищевые субстраты), действуют как *аттрактанты* в том смысле, что клетки скапливаются в области более высокой концентрации этого вещества. Другие (большей частью токсичные) вещества действуют как *репелленты*, т. е. клетки избегают районов высокой концентрации этих веществ и собираются в той части градиента, где их концентрация наименьшая. Такое поведение называют *хемотаксисом*. Для разных бактерий специфические вещества, вызывающие ответные реакции, неодинаковы, и каждый вид характеризуется своим особым химическим спектром.

У большинства подвижных бактерий *молекулярный кислород* вызывает ответные реакции так называемого *аэротаксиса*. Картины распределения бактериальных клеток, обусловленного аэротаксисом, можно легко наблюдать во влажных препаратах, где градиент кислорода устанавливается за счет его диффузии, направленной от краев покровного стекла к центру препарата. Большая часть облигатных аэробов скапливается у краев покровного стекла, в то время как спироиллы, относящиеся к микроаэрофилам, собираются в виде узкой полосы на некотором расстоянии от них. Для подвижных облигатных анаэробов кислород является репеллентом, и они сосредотачиваются в центре влажного препарата, где концентрация кислорода наименьшая (рис. 11.36).

Адлер (J. Adler) с сотрудниками детально изучили реакции хемотаксиса у клеток *E. coli* на органические соединения (сахара и аминокислоты). Их исследования показали, что далеко не все соединения, которые могут служить питательными веществами, играют роль аттрактантов. Например, дисахарид мальтоза — аттрактант, а дисахарид лактоза (тоже хороший субстрат) не обладает таким свойством, хотя про-

дукты его расщепления (глюкоза и галактоза) представляют собой атрактанты. И наоборот, аминокислота серин — сильнодействующий атрактант, а пируват, первый образующийся из него продукт, таковым не является. Соединения, действующие как атрактанты, не обязательно подвергаются метаболизму; например, D-фукоза — неметаболизируемый аналог D-галактозы — почти такой же хороший атрактант, как и галактоза. Для систематического изучения реакций *E. coli* на сахара и аминокислоты использовались мутанты, не способные метаболизировать или узнавать атрактанты. Проводилось также изучение конкуренции между различными атрактантами. Эти исследования привели к идентификации 11 отдельных хеморецепторов, каждый из которых способен вызывать ответную реакцию на некоторые специфические соединения (табл. 11.3). Установлено, что в роли рецепторных

ТАБЛИЦА 11.3

ХЕМОРЕЦЕПТОРЫ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ САХАРОВ И АМИНОКИСЛОТ И ИХ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Название хеморецептора	Узнаваемые вещества (в порядке уменьшения чувствительности)	Вещества, узнаваемые более чем одним рецептором
Аспартатный	L-аспартат > L-глутамат > L-метионин	Аспарагин, цистеин
Сериновый	L-серин > Глицин > L-аланин	
Глюкозный	D-глюкоза, D-манноза	D-глюкозамин 2-дезоксид-D-глюкоза, метил- α -D-глюкозид, метил- β -D-глюкозид
Галактозный	D-галактоза, D-глюкоза > D-фукоза > L-арабиноза > D-ксилоза > L-сорбоза	
Фруктозный	D-фруктоза	
Маннитный	D-маннит	
Рибозный	D-рибоза	
Сорбитный	D-сорбит	
Трегалозный	Трегалоза	
N-ацетил-глюкозаминный	N-ацетил-D-глюкозамин	
Мальтозный	Мальтоза	

молекул для галактозы и мальтозы выступают связывающие белки (см. стр. 65), специфичные для данных сахаров и локализованные в периплазме клетки. Мутанты, утратившие один из этих связывающих белков, теряют способность реаги-

ровать на соответствующий сахар. Хеморецепторы служат только *градиент-чувствительными устройствами* и прямо не связаны с органами движения, так как утрата в результате мутации специфических хеморецепторов не нарушает подвижности клеток.

В связи с бактериальным хемотаксисом возникает вопрос: каким образом такие мелкие организмы определяют концентрационные различия химических градиентов на расстоянии длины отдельной клетки (2—3 мкм)? Недавние эксперименты показали, что на самом деле бактерия не производит непосредственного *пространственного* сравнения концентраций аттрактанта на двух концах клетки. Вместо этого она использует *временную* градиент-чувствительную систему, т. е. в некотором роде ячейку «памяти», позволяющую клетке сравнить настоящую и прошлую концентрации вещества за короткий период времени. Время затухания в системе памяти составляет многие секунды. Таким образом, если бактерия проплывает расстояние в 30 мкм за 1 с, а ее память имеет время затухания, равное 60 с, она может сравнивать концентрации вещества на расстоянии около 1,8 мм, что почти в 1000 раз превышает длину ее тела. При этом требуется на несколько порядков меньшая точность, чем та, которая была бы необходима при использовании системы непосредственного пространственного определения концентрации.

Наконец, мы должны рассмотреть вопрос о том, каким образом бактерия, используя информацию, полученную с помощью такого зависимого от времени процесса, перемещается в направлении более высокой концентрации аттрактанта. По-видимому, механизм такого перемещения (по крайней мере у *E. coli* и родственных бактерий) основан на частоте кувырканий клетки, другими словами, на частоте, с которой направление вращения жгутикового мотора изменяется на противоположное. Бактерия, плывущая в направлении возрастания концентрации аттрактанта, воспринимает положительный временной градиент и кувыркается с меньшей частотой, чем обычно. В то же время бактерия, плывущая в направлении снижения концентрации аттрактанта и воспринимая отрицательный временной градиент, кувыркается чаще обычного. Так как каждое кувыркание вызывает случайное изменение направления движения, в итоге клетка, находящаяся в градиенте, большую часть времени плывет в сторону повышения градиента, а не наоборот: отсюда характерная миграция бактерий в область более высокой концентрации аттрактанта.

ФОТОТАКСИС ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ

Подвижные пурпурные бактерии могут реагировать на *градиент интенсивности света* — явление, известное как *фототаксис*. Такое поведение можно легко продемонстрировать,

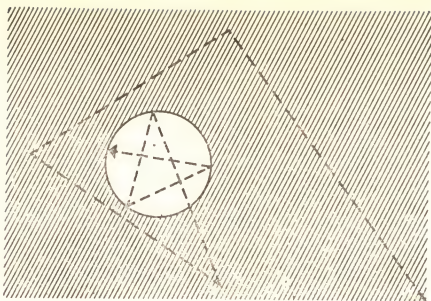
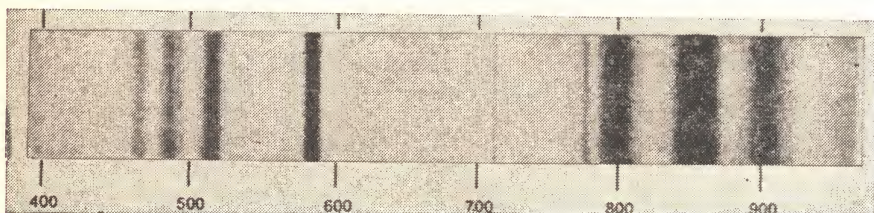


Рис. 11.37. Схема действия «световой ловушки». Пунктирная линия показывает траекторию пурпурной бактерии в темном поле с единственной освещенной областью, изображенной белым кружком.

Рис. 11.38. Картина распределения обладающих фототаксисом пурпурных бактерий при освещении влажного препарата светом, полученным в результате разложения белого света. Клетки собираются в тех

участках спектра, которые соответствуют линиям поглощения участвующих в фотосинтезе хлорофилла и каротиноидов. Участки спектра рядом с длиной волны 500 нм, в которых наблюдается относительно слабое скопление клеток, соответствуют положению полос

поглощения каротиноидов; скопления клеток при 590, 800, 850 и 900 нм соответствуют положениям полос поглощения хлорофилла. [Buder J., Zur Biologie des Bakteriopurpurs und der Purpurbakterien, Jahrb. wiss. Botan., 58, 525 (1919).]



проектируя узкий пучок яркого света на слабо освещенную в остальных участках суспензию подвижных пурпурных бактерий, в которой клетки распределены равномерно и движутся беспорядочным образом. За 10—30 мин большая часть популяции собирается в ярком пятне, действующем как «световая ловушка». Механизм такого перемещения показан на рис. 11.37. Плавающая клетка попадает в световое пятно за счет случайного движения. Попав в него однажды, она не в состоянии его покинуть вследствие *двигательного шока* (т. е. внезапного изменения направления перемещения), возникающего каждый раз, когда она пересекает резкий градиент интенсивности света, отделяющий ярко освещенное пятно от окружающей его более темной области.

Если влажный препарат подвижных пурпурных бактерий освещать не белым светом, а светом, разложенным в спектр в результате пропускания его через призму, то при фокусировании лучей на препарате клетки быстро собираются в полосах, соответствующих основным максимумам поглощения пигментных систем этих бактерий, участвующих в фотосинтезе

(рис. 11.38). Точное количественное определение относительной эффективности различных длин волн, вызывающих фототаксис, показало, что спектр действия фототаксиса пурпурных бактерий точно соответствует спектру действия фотосинтеза.

ОСОБЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ ПРОКАРИОТ

Как уже упоминалось, большинство прокариот не образует внутриклеточных органелл, ограниченных элементарными мембранами; единственным возможным исключением являются тилакоиды, вмещающие фотосинтезирующий аппарат цианобактерий. Однако у прокариот имеются три класса органелл, окруженных мембранами (которые отличаются от элементарной мембраны и состоят, по-видимому, из белка). Это *газовые пузырьки*, *хлоробиум-везикулы* и *карбоксисомы* (*поллиздральные тела*).

ГАЗОВЫЕ ПУЗЫРЬКИ И ГАЗОВЫЕ ВАКУОЛИ

Поскольку плотность клеток несколько выше плотности воды, в водной среде они оседают со скоростью, зависящей от их размера. Противодействием этому процессу служит активное передвижение клеток, направленное против силы гравитации. Однако многие водные прокариоты (табл. 11.4) вы-

ТАБЛИЦА 11.4

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГАЗОВЫХ ВАКУОЛЕЙ У ВОДНЫХ ПРОКАРИОТ

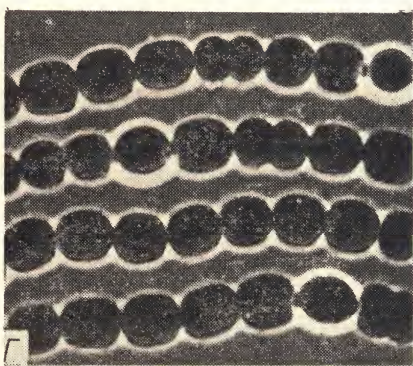
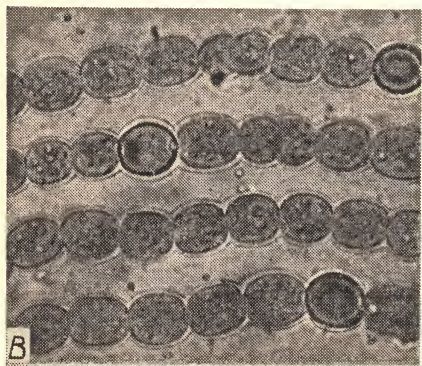
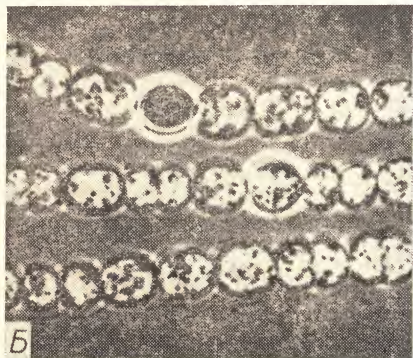
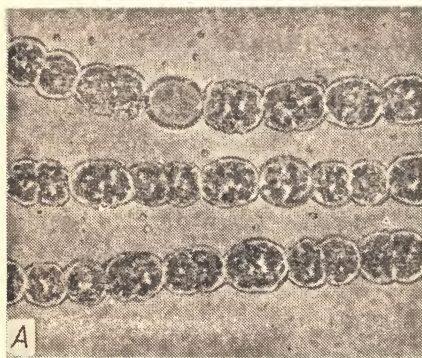
А. Фототрофы	Б. Хемотрофы
Пурпурные серные бактерии: <i>Lamprocystis</i> , <i>Thiodictyon</i> , <i>Thiopedia</i> , <i>Amoebobacter</i>	<i>Halobacterium</i> <i>Microcycilus</i>
Зеленые бактерии: <i>Pelodictyon</i> , <i>Clathrochloris</i>	<i>Prosthecomicrobium</i>
Цианобактерии: <i>Microcystis</i> , <i>Spirulina</i> (некоторые виды), <i>Oscillatoria</i> (некоторые виды), <i>Pseudanabaena</i> , <i>Anabaena</i> (некоторые виды), <i>Clostridium</i> (некоторые виды), <i>Tolypothrix</i> (некоторые виды)	<i>Ancalomicrobium</i> <i>Pelonema</i> <i>Thiothrix</i>

работали иной способ противодействия силе гравитации: их клетки содержат наполненные газом структуры, называемые *газовыми вакуолями* (*аэросомами*). В световом микроскопе газовые вакуоли выглядят как образования, сильно преломляющие свет и не имеющие четких очертаний (рис. 11.39). Если на такие клетки воздействовать внезапным и резким увеличением гидростатического давления, то газовые вакуоли сжимаются, в результате чего клетки утрачивают плавучесть и уже не так сильно преломляют свет (рис. 11.40).

Рис. 11.39. Микрофотографии нитей цианобактерий, содержащих газовые вакуоли, в светлом поле (А) и при фазово-контрастном освещении (Б). Нити той же

самой культуры, в которых газовые вакуоли были сжаты под действием давления; сфотографированы в светлом поле (В) и при фазово-контрастном освещении (Г).

Пустые клетки — гетероцисты, которые никогда не содержат газовых вакуолей. [Walsby A. E., Structure and function of gas vacuoles, Bact. Revs., 36, 1 (1972).]



С помощью электронной микроскопии было показано, что газовые вакуоли — это сложные органеллы, состоящие из переменного количества индивидуальных газовых пузырьков (рис. 11.41). Каждый газовый пузырек представляет собой полый цилиндр с конусообразными концами, имеющий диаметр 75 нм и длину 200—1000 нм. Пузырьки окружены слоем белка толщиной 2 нм и собраны в регулярные ряды субъединиц («ребер»), уложенных под прямым углом к их длинной оси (рис. 11.42).

Так как газовые пузырьки обеспечивают сохранение заполненного газом пространства внутри клетки, первоначально предполагали, что ограничивающая их мембрана непроницаема для газов. Однако Уолсби (A. Walsby) показал, что

Рис. 11.40. Влияние резкого повышения гидростатического давления на светорассеяние и плавучесть суспензии цианобактерий, содержащих газовые вакуоли. Давле-

ние было приложено к суспензии во флаконе, расположенном слева, суспензия во флаконе справа обработке не подвергалась. А. Вид суспензий непосред-

ственно после приложения давления. Б. Вид суспензий через несколько часов. [Walsby A. E., Structure and function of gas vacuoles, Bact. Revs., 36, 1 (1972).]



Рис. 11.41. Электронная микрофотография ультратонкого среза клетки *Oscillatoria* ($\times 25\,800$). Видны расположенные внутри клетки цилиндрические газовые пузырьки, из которых состоят газовые вакуоли. (Фото предоставлено Жермной Коэн-Базир.)

(рис. 11.43). Поэтому в пузырьках газ не может ни запасаться, ни накапливаться; состав и давление газа в пузырьке зависят от количества газов, растворенных в окружающей среде. Вода из внутренней части пузырьков удаляется в процессе их образования и роста. Этот вывод подтверждается

Рис. 11.42. Электронная микрофотография очищенных газовых пузырьков, выделенных из клеток *Oscillatoria* и

негативно окрашенных ацетатом уранила ($\times 103\,000$). Пузырьки все еще наполнены газом. Видна упорядочен-

ная тонкая структура стенки пузырьков. (Фото предоставлено Жерменой Коэн-Базир.)

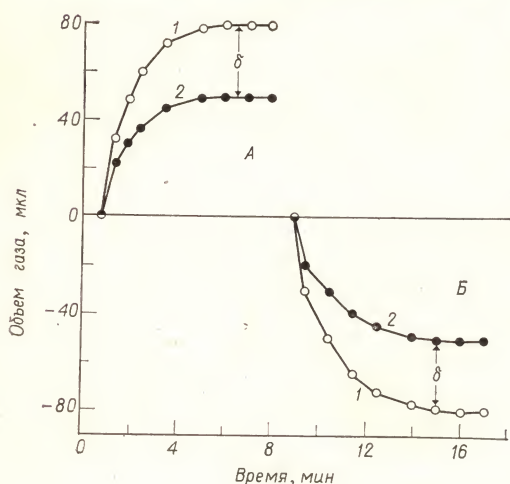


Рис. 11.43. А. Выделение газа двумя суспензиями цианобактерий в ответ на внезапное снижение давления окружающей газовой фазы. Обе суспензии идентичны, за исключением того, что одна из них (1) содержит газовые вакуоли, а в другой (2) они были сжаты под действием давления до начала данного эксперимента. Б. Поглощение газа теми же суспензиями после быстрого возврата давления в окружающей газовой фазе к атмосферному. Разница δ соответствует объему газа, заключенного внутри вакуолей. [Walsby A. E., Structure and function of gas vacuoles, Bact. Revs., 36, 1 (1972).]

тем фактом, что после сплющивания под действием давления пузырьки не восстанавливаются; клетка может воспроизводить заполненные газом пузырьки только путем образования этих структур de novo.

По-видимому, в сохранении газовой фазы внутри пузырьков важную роль играют два фактора. Один из них — это
134 структурная прочность окружающей пузырьки белковой мем-

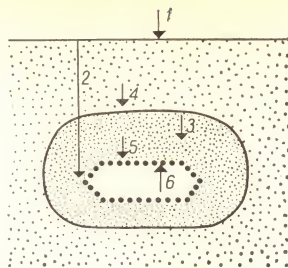


Рис. 11.44. Схема, на которой показаны виды давлений, действующих на стенку газового пузырька в клетке: 1 — атмосферное давление; 2 — гидростатическое давление; 3 — тургорное давление; 4 — давление поверхностного натяжения клеточной стенки; 5 — давление поверхностного натяжения стенки пузырька; 6 — давление газа в вакуоли.

браны, которая должна быть способна противостоять всем видам давления, действующим на нее в норме (рис. 11.44). Другим фактором является химическая природа мембранного белка. Его наружная поверхность имеет отчетливо гидрофильный характер и легко смачивается водой, в то же время его внутренняя поверхность должна быть сильно гидрофобной, чтобы вода не могла проникать внутрь пузырьков и накапливаться там.

Как показано в табл. 11.4, газовые вакуоли встречаются у прокариотических организмов, заметно различающихся в метаболическом и физиологическом отношении. Эти организмы сходны только в экологическом плане: все они являются водными обитателями. Поэтому можно не сомневаться, что газовые вакуоли у обладающих ими организмов выполняют роль регуляторов плавучести, позволяя клетке занимать в слое воды оптимальное для метаболической активности положение относительно интенсивности света, концентрации растворенного кислорода или содержания питательных веществ.

ХЛОРОБИУМ - ВЕЗИКУЛЫ

У одной из групп фотосинтезирующих прокариот — зеленых бактерий — фотосинтезирующий аппарат имеет характерную внутриклеточную локализацию: он размещается в ряде сигарообразных пузырьков, образующих кортикальный слой, лежащий непосредственно под клеточной мембраной, но физически от нее отделенный (рис. 11.45). Эти структуры шириной 50 нм и длиной 100—150 нм окружены однослойной мембраной толщиной 3—5 нм. Их можно обнаружить только методом электронной микроскопии (рис. 11.46). В них содержатся все пигменты, участвующие в фотосинтезе. В изолированных поврежденных пузырьках видны мелкие субъединицы шириной около 10 нм с центральной полостью; вероятно, это — структуры фотосинтезирующего аппарата. Таким образом, зеленые бактерии занимают уникальное положение среди фототрофных организмов благодаря тому, что их фото-

Рис. 11.45. Электронная микрофотография ультратонкого среза зеленой бактерии *Pelodictyon*, показывающая связь хло-

робиум-везикул (1) с другими частями клетки ($\times 81\,800$). 2 — клеточная стенка; 3 — клеточная мембрана; 4 — ри-

босомы; 5 — нуклеоплазма. (Фото предоставлено Жерменой Коэн-Базир.)

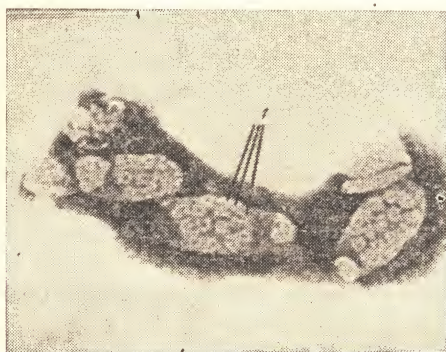
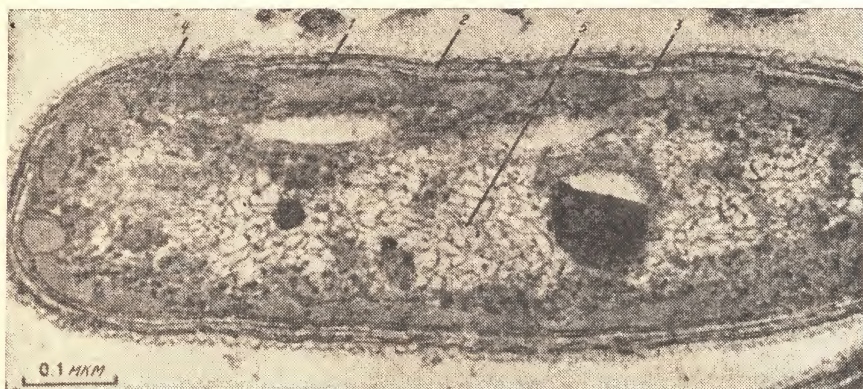


Рис. 11.46. Электронная микрофотография хлоробиум-везикул, выделенных из клеток *Chlorobium thiosulfatophilum* и негативно окрашенных фосфовольфрамом ($\times 68\,000$). Обратите внимание на включения внутри пузырьков (1). (Фото предоставлено д-ром Д. Л. Круденом.)

синтезирующий аппарат не включен в систему элементарной мембраны¹.

КАРБОКСИСОМЫ (ПОЛИЭДРАЛЬНЫЕ ТЕЛА)

Ряд фотосинтезирующих (цианобактерии, некоторые пурпурные бактерии) и хемолитотрофных (нитрифицирующие бактерии, тиабациллы) бактерий содержит структуры, называемые *полиэдральными телами*, шириной 50—500 нм, имеющие контур многоугольника. Их гранулярное содержимое окруже-

¹ Сейчас показано, что в пузырьках у зеленых бактерий находится только часть пигментов, выполняющая, видимо, функцию антенны. Другая часть фотосинтезирующего аппарата, включая реакционные центры, локализована в клеточной мембране. — *Прим. ред.*

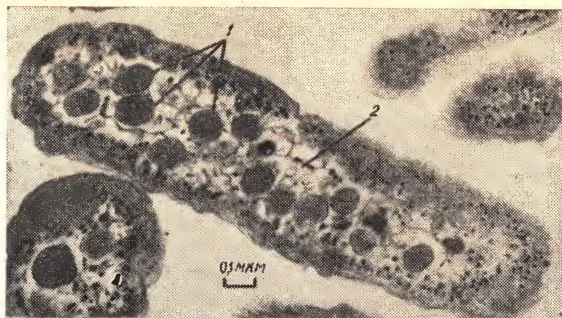


Рис. 11.47. Электронная микрофотография среза клетки *Thiobacillus*, содержащей многочисленные карбоксисомы (1). 2 — нуклеоплазма. [Shiveley J. M., Ball F. L., Kline B. W., Electron microscopy of the carboxysomes (polyhedral bodies) of *Thiobacillus neapolitanus*, J. Bact., 116, 1405 (1973).]

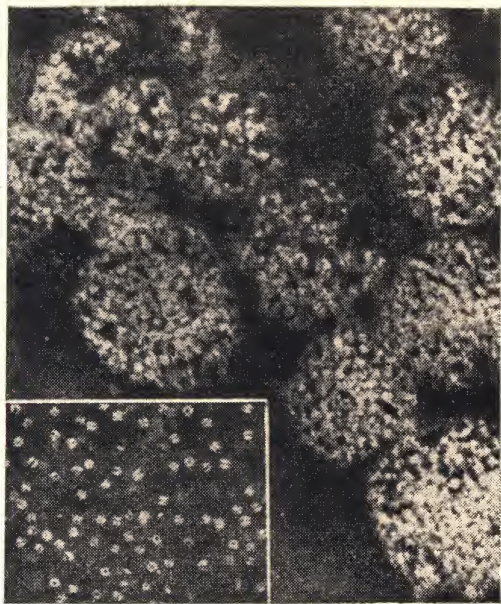


Рис. 11.48. Электронные микрофотографии очищенных карбоксисом из клеток *Thiobacillus* и выделенного из них фермента рибулозодифосфаткарбоксилазы (вставка). (Негативное окрашивание, $\times 108\,000$.) [Shiveley J. M., Ball F. L., Brown D. H., Saunders R. E., Functional organelles in procariotes: polyhedral inclusion (carboxysomes) of *Thiobacillus neapolitanus*, Science, 182, 584 (1973).]

но однослойной мембраной толщиной около 3,5 нм (рис. 11.47). Такие структуры, выделенные недавно из клеток в изолированном виде (рис. 11.48), содержат большую часть клеточной рибулозодифосфаткарбоксилазы (карбоксидисмутазы) — ключевого фермента процесса фиксации CO_2 в цикле Кальвина — Бенсона. Они называются также *карбоксисомами* и, по-видимому, являются местом фиксации CO_2 у этих автотрофных прокариот.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ЗАПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПРОКАРИОТ

У прокариотических организмов встречаются различные внутриклеточные запасные вещества, которые часто выявляются в виде гранулярных цитоплазматических включений.

БЕЗАЗОТИСТЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ЗАПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Среди прокариотических организмов широко распространены два химически различных типа безазотистых органических запасных веществ, каждый из которых может служить внутриклеточным источником углерода или энергии (табл. 11.5). К ним относятся полисахариды, содержащие глюкозу (α -1,4-глюканы), такие, как крахмал и гликоген, а также полиэфир β -оксимасляной кислоты — поли- β -оксимасляная кислота. Первый класс полимеров встречается в качестве резервных веществ также и у многих эукариотических организмов, тогда как поли- β -оксимасляная кислота найдена исключительно у прокариот. Прокариоты не запасают нейтральных жиров, откладываемых как запасные вещества эукариотами: следовательно, поли- β -оксимасляную кислоту можно рассматривать как эквивалент этого типа запасного материала у прокариот.

Общим правилом является образование каждым видом только одного типа резервного материала. Так, многие бактерии кишечной группы, а также анаэробные спорообразую-

ТАБЛИЦА 11.5

РАСПРОСТРАНЕНИЕ У ПРОКАРИОТ БЕЗАЗОТИСТЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ
ЗАПАСНЫХ ВЕЩЕСТВ¹

А. Гликоген

Цианобактерии (большинство представителей)

Энтеробактерии (большинство родов, за исключением перечисленных в пункте Б)

Спорообразующие бактерии: многие виды *Bacillus* и *Clostridium*

Б. Поли- β -оксибутират

Энтеробактерии: роды *Beneckea* и *Photobacterium*

Pseudomonas (многие виды)

Группа азотобактера (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*)

Rhizobium

Moraxella (некоторые виды)

Spirillum

Sphaerotilus

Bacillus (некоторые виды)

В. Гликоген и поли- β -оксибутират

Цианобактерии (несколько видов)

Пурпурные бактерии

Г. Запасные вещества не обнаружены

Зеленые бактерии²

Pseudomonas (многие виды)

Acinetobacter

¹ Этот список неполный и включает только те группы, в которых проводилось систематическое изучение запасных веществ.

² У зеленых бактерий обнаружена полиглюкоза (глюкан). — Прим. ред.

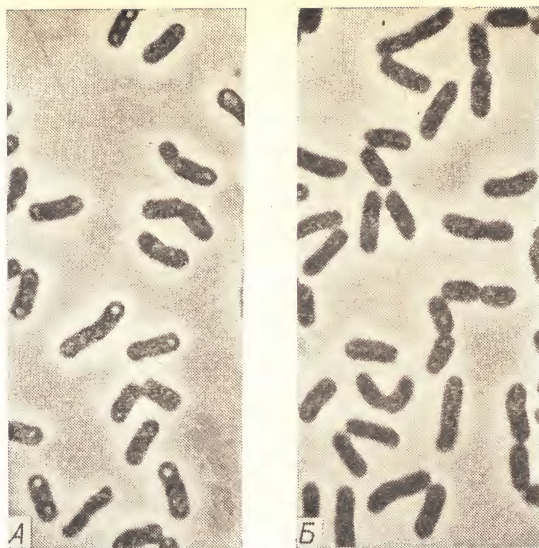


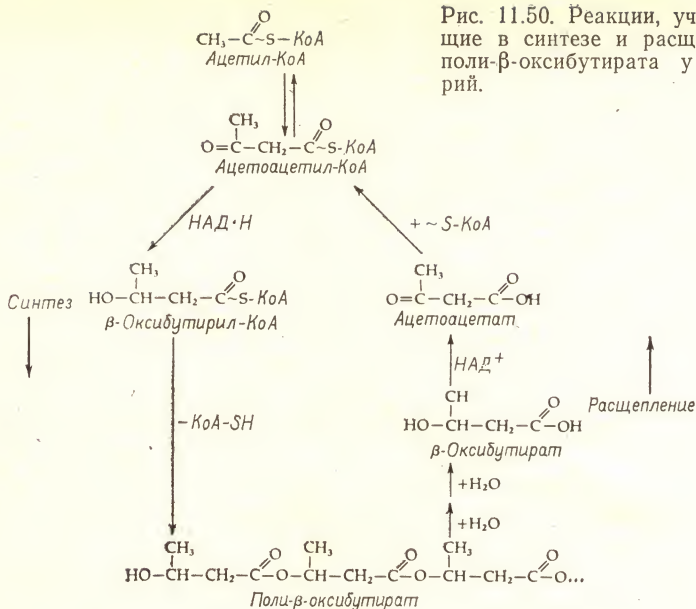
Рис. 11.49. Образование и использование поли- β -оксимасляной кислоты в клетках *Bacillus megaterium* (фазовый контраст, $\times 2200$). А. Клетки выращены при высокой концентрации глюкозы и ацетата. Все клетки содержат одну или большее число гранул поли- β -оксимасляной кислоты (светлые зоны). Б. Клетки той же культуры после инкубации в течение 24 ч с источником азота в отсутствие внешнего источника углерода. Почти все гранулы полимера исчезли. (Фото предоставлено Дж. Уилкинсоном.)

щие бактерии (*Clostridium*) синтезируют только гликоген или крахмал, в то время как многие виды *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Spirillum* и *Bacillus* в качестве запасного вещества образуют только поли- β -оксибутират. Однако некоторые бактерии могут синтезировать оба типа резервных материалов, что характерно, в частности, для пурпурных бактерий. Наконец, следует отметить, что ряд бактерий (например, флуоресцирующие виды рода *Pseudomonas*) вообще не образует специфических безазотистых органических запасных веществ.

Резервные полисахариды бактерий откладываются более или менее равномерно по всей цитоплазме. Эти участки не видны в световом микроскопе, но их можно обнаружить с помощью электронного микроскопа. Наличие больших количеств таких запасов в клетках можно установить путем обработки клеток раствором иода в иодистом калии, который окрашивает неразветвленные полимеры глюкозы (например, крахмал) в темно-синий цвет, а разветвленные (такие, как гликоген) — в красно-коричневый. Однако отложения поли- β -оксибутирата легко различимы в световом микроскопе в виде разбросанных по клетке преломляющих гранул разного размера. Они специфически окрашиваются судановым черным, подобно отложениям нейтральных липидов у других организмов. По этой причине гранулы поли- β -оксибутирата у бактерий иногда неправильно принимали за отложения жира.

Как правило, в активно растущих клетках наблюдается относительно низкое содержание этих запасных веществ. Они накапливаются в больших количествах лишь в тех клетках,

Рис. 11.50. Реакции, участвующие в синтезе и расщеплении поли-β-оксибутирата у бактерий.



которые испытывают недостаток в азоте, но располагают доступным углеродсодержащим источником энергии. В таких условиях синтез нуклеиновых кислот и белка заторможен и большая часть ассимилированного углерода превращается в запасные вещества, количества которых могут достигать 50% сухой массы клетки. Если такие клетки лишить внешнего источника углерода и снабдить подходящим источником азота (например, NH_4Cl), запасные вещества начинают использоваться для синтеза нуклеиновых кислот и белка (рис. 11.49). По существу, образование глюканов или поли-β-оксибутирата служит способом накопления запаса углерода в *осмотически инертной* форме. В случае синтеза поли-β-оксибутирата это также является способом *нейтрализации кислого метаболита*, поскольку в результате образования сложноэфирных связей между субъединицами полимера карбоксильная группа β-оксимаслной кислоты элиминируется. Таким образом, клетка может вместить большой запас этих материалов, тогда как накопление внутри клетки эквивалентного количества свободной глюкозы или β-оксимаслной кислоты привело бы к катастрофическим физиологическим последствиям.

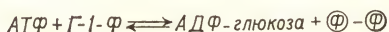
Накопление и последующее повторное использование запасов углерода осуществляется особым ферментативным аппаратом, находящимся под строгим регуляторным контролем. Поли-β-оксибутират образуется в результате ответвления метаболического пути синтеза жирных кислот (рис. 11.50).

Рис. 11.51. Реакции, участвующие в синтезе и расщеплении гликогена у бактерий.



Природные гранулы полимера связаны со сложной системой его деградации. В нативных гранулах полимер не может расщепляться до тех пор, пока не произойдет «активация» гранул с помощью фермента, нуждающегося в ионах Ca^{2+} и относящегося, вероятно, к протеолитическим ферментам, так как его действие может имитировать трипсин. Активированные гранулы подвергаются воздействию деполимеразы, гидролизующей полимер до димерных эфиров, которые затем превращаются специфической димеразой в свободную β -оксимасляную кислоту. Существенной особенностью этой системы является то, что *деполимераза не способна гидролизовать химически очищенный полимер*; единственный субстрат, который она может расщеплять, — это активированные гранулы полимера. Даже относительно мягкие воздействия на нативные гранулы полимера (например, замораживание и оттаивание) могут препятствовать их расщеплению внутриклеточной системой деградации.

Бактериальный синтез гликогена инициируется образованием АДФ-глюкозы из глюкозо-1-фосфата и АТФ в результате действия фермента глюкозопирофосфорилазы:



что сопровождается переносом глюкозильного остатка на акцепторную молекулу α -1,4-глюкана, осуществляемым гликогенсинтетазой. Расщепление гликогена, которое происходит под действием гликогенфосфорилазы, приводит к образованию глюкозо-1-фосфата (рис. 11.51).

Синтез гликогена у прокариот регулируется на уровне АДФ-глюкозопирофосфорилазы, аллостерического фермента, который ингибируется АМФ, АДФ или неорганическим фосфатом и активируется промежуточными продуктами диссимиляции углеводов, такими, как пируват, фруктозо-6-фосфат и фруктозо-1,6-дифосфат. По механизму и месту регуляции синтез гликогена у прокариот напоминает синтез крахмала у водорослей и высших растений. Он отличается от синтеза гликогена дрожжами и млекопитающими, у которых субстра-

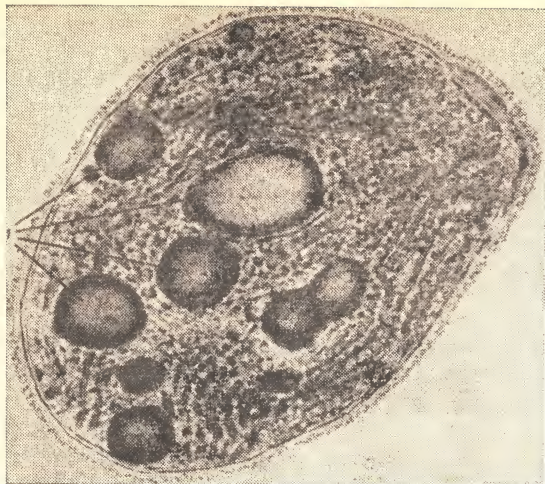


Рис. 11.52. Электронная микрофотография среза одноклеточной цианобактерии, содержащей гранулы цианофицина (1) ($\times 28\,800$). (Фото предоставлено д-ром Мэри Меннес Аллен.)

том синтеза служит УДФ-глюкоза, в то время как аллостерическая регуляция происходит на уровне гликогенсинтетазы, а не АДФ-глюкозопирофосфорилазы.

АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ ЗАПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Как правило, прокариоты не образуют внутриклеточных азотсодержащих органических запасных веществ. Однако многие цианобактерии накапливают азотсодержащий резервный материал, называемый *цианофицином*, при достижении культурами стационарной фазы. Цианофициновые гранулы, имеющие вид характерных структур на электронных микрофотографиях (рис. 11.52), недавно были выделены и идентифицированы как сополимеры аргинина и аспарагиновой кислоты. Этот материал, который может составлять до 8% сухого вещества клетки, быстро подвергается расщеплению при возобновлении роста клеточной культуры. Образование цианофицина не связано с обычным механизмом белкового синтеза, так как он накапливается в клетках в условиях подавления синтеза белка под действием хлорамфеникола.

ГРАНУЛЫ ВОЛЮТИНА

Многие микроорганизмы, как прокариоты, так и эукариоты, могут накапливать гранулы волютина, которые окрашиваются основными красителями, например метиленовым синим (рис. 11.53). Эти образования иногда называют также *метахроматическими гранулами*, поскольку они обнаруживают *метахроматический эффект*, т. е. приобретают красную окраску при обработке синим красителем. На электронных микрофотографиях бактерий они выглядят как тела с очень большой электронной плотностью. Своими метахроматическими

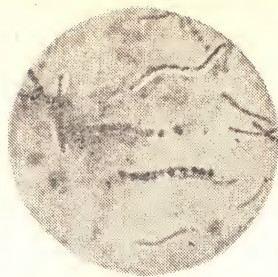
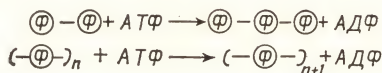


Рис. 11.53. Волютин («метахроматические гранулы») в клетках *Spirillum*, выявляемый путем окрашивания метиленовым синим ($\times 850$). (Giesberger G., Beitrage zur Kenntniss der Gattung *Spirillum* Fhbg, p. 36, 1936.)

свойствами гранулы волютина обязаны присутствию больших количеств неорганического полифосфата. Полифосфаты представляют собой линейные полимеры ортофосфата с различной длиной цепи.

Довольно детально изучены условия накопления волютина в бактериях. В общем голодание клеток в отношении почти любого питательного вещества приводит к образованию волютина. Недостаток сульфата сказывается особенно эффективно, вызывая быстрое и массивное накопление полифосфата. Когда клетки, создавшие запас полифосфата, снова снабжают сульфатом, полифосфат быстро исчезает и включается в нуклеиновые кислоты, как показывают опыты с меченым ^{32}P . Поэтому гранулы волютина можно рассматривать в первую очередь как внутриклеточный резерв фосфата, образующийся при различных условиях, препятствующих синтезу нуклеиновых кислот. Образование полифосфата происходит путем последовательного присоединения остатков фосфата к пирофосфату, причем донором служит АТФ:



Если бы расщепление полифосфатов происходило путем обращения этой реакции, то полифосфаты могли бы служить источником АТФ для клетки. Однако пока еще твердо не доказано, что они действительно выполняют такую функцию.

ВКЛЮЧЕНИЯ СЕРЫ

Включения неорганической серы встречаются в двух физиологических группах: у пурпурных серобактерий, использующих H_2S как донор электронов при фотосинтезе, и у нитетивидных нефотосинтезирующих организмов, таких, как *Beggiatoa* и *Thiothrix*, использующих H_2S в качестве окисляемого субстрата. У обеих этих групп накопление серы

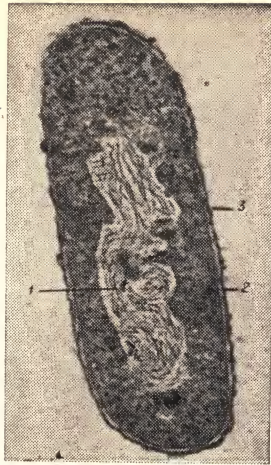


Рис. 11.54. Электронная микрофотография ультратонкого среза делящейся клетки одноклеточной прокариоты *Bacillus subtilis* ($\times 20\,000$). 1 — ядро; 2 — цитоплазматическая мембрана; 3 — клеточная стенка. (Фото предоставлено С. Ф. Рабиноу.)

если среда содержит сульфид; после полного исчерпания в среде сульфида запасенная сера окисляется далее до сульфата.

ЯДРО

РАСПОЗНАВАНИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЯДЕР

Основные красители, избирательно окрашивающие хроматин эукариотических ядер, равномерно и интенсивно окрашивают всю бактериальную клетку. Базофильные свойства бактериальной клетки обусловлены наличием в ней очень большого числа рибосом, которые создают необычно высокое содержание нуклеиновой кислоты в области цитоплазмы. Поэтому для избирательного окрашивания бактериальных ядер фиксированные клетки необходимо предварительно обработать рибонуклеазой или разбавленной HCl, которые гидролизуют рибосомную РНК. Последующее окрашивание основным красителем выявляет бактериальные ядра в виде плотных тел, расположенных в центре клетки и имеющих неправильные очертания; в экспоненциально растущей клетке их содержится от 2 до 4 (см. рис. 3.18). С помощью фазово-контрастной микроскопии можно наблюдать рост и деление бактериальных ядер в живых клетках при условии, что последние помещены в среду, которая усиливает контраст между нуклеоплазмой и цитоплазмой, например в концентрированный раствор белка (см. рис. 3.17).

Изучению структуры бактериального ядра препятствовали вначале трудности, связанные с получением удовлетвори-



Рис. 11.55. Радиоавтограф хромосомы *E. coli*, штамм K12, меченной ^3H -тимидином в течение двух генераций, а затем экстрагированной, как описано в тексте. На вставке: схема той же структуры, показывающая участки (1, 2, 3), в которых либо обе цепи содержат тритий (сплошная двойная линия), либо только одна цепь является меченой (одна сплошная и одна пунктирная линии). *x* — начальная точка репликации (репликатор), *y* — репликативная вилка. [Cairns J., The chromosome of *Escherichia coli*, Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 43 (1964).]

блема была разрешена, ядро было обнаружено на электронных микрофотографиях (рис. 11.54) в виде участка, плотно заполненного тонкими нитями ДНК. Эта область не отделена мембраной от цитоплазмы и, по-видимому, не содержит других структур, кроме нитей ДНК.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ХРОМОСОМА

К 1960 г. цитологические сведения о структуре бактериального ядра были дополнены данными генетических исследований *E. coli*, которые привели к выводу о существовании у бактерий единственной кольцевой группы сцепления. Это в свою очередь указывало на то, что каждое ядро должно содержать единственную кольцевую хромосому. Если это действительно так, то нити ДНК, обнаруженные в ядерной области методом электронной микроскопии, должны представлять собой участки чрезвычайно длинной кольцевой молекулы ДНК, сильно скрученной и благодаря этому образующей компактную структуру.

В 1963 г. Кейрнсу (J. Cairns) удалось экстрагировать ДНК из клеток *E. coli* в условиях, сводящих к минимуму фрагментирование молекул. В этих опытах клетки, выращенные в присутствии ^3H -тимидина, который включается только в ДНК, помещали в камеру, закрытую с одного конца герметически, а с другого — мембранным фильтром. Затем клетки подвергали мягкому лизису путем диализа против раствора детергента, например натриевой соли лаурилсульфата, или против раствора лизоцима и этилендиаминтетрауксусной

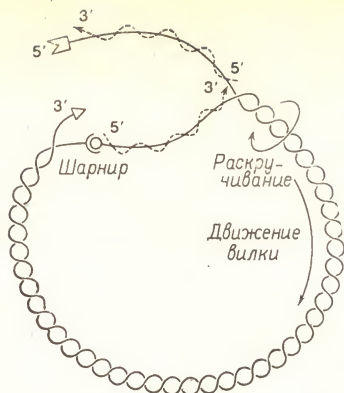


Рис. 11.56. Репликация двойной кольцевой спирали. Одна цепь двойной спирали разрывается, а другая служит шарниром, обеспечивающим раскручивание репликативной вилки. Вновь синтезированные комплементарные цепи ДНК показаны пунктирными линиями.

кислоты (ЭДТА). Дальнейшая обработка была направлена на отделение от ДНК всех связанных с нею белков; при проведении этих опытов материал ни разу не подвергали механическому перемешиванию, так как реагенты поступали в камеру и выходили из нее через мембранный фильтр в результате *диффузии*. На последнем этапе мембрану прокалывали и после подсушивания камеры помещали на пластинку для радиоавтографии.

Во время заключительного высушивания камеры ДНК отдельных бактериальных клеток распределялась по поверхности мембранного фильтра. Изучение проявленных радиоавтографов показало, что ДНК представляет собой чрезвычайно протяженные нити, наибольшая длина которых несколько превышает 1 мм. Кроме того, некоторые из них оказались *кольцевыми* (рис. 11.55). Эти нити уложены внутри клеток, имеющих среднюю длину около 2 мкм.

Длина нити ДНК, равная 1 мм, хорошо согласуется с количеством ДНК в ядре, определенным химическими методами, при условии, что структура на радиоавтографах Кейрнса представляет собой растянутую двойную спираль. Это количество ДНК соответствует приблизительно $5 \cdot 10^6$ пар оснований и мол. весу около $3 \cdot 10^9$.

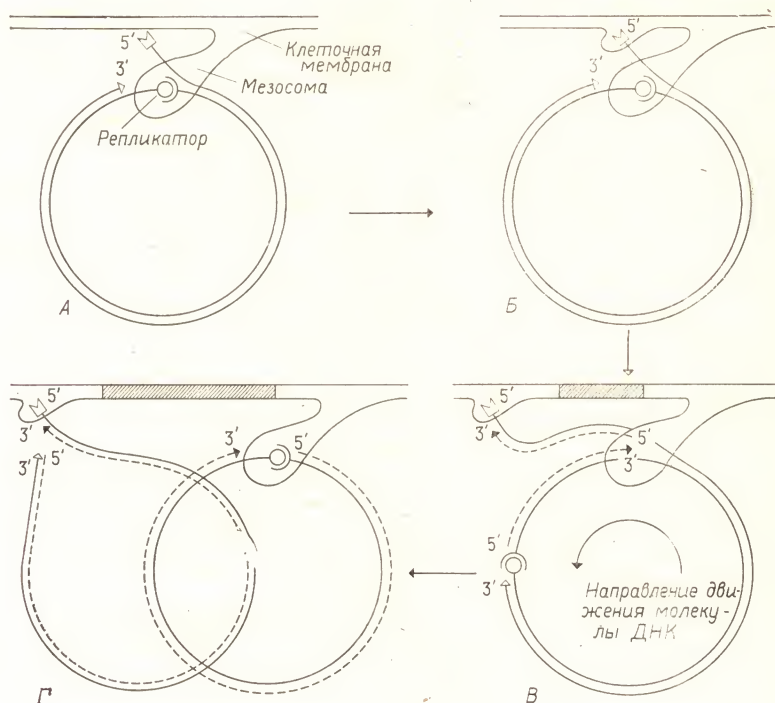
ДНК — сильно заряженная молекула, так как входящие в ее состав основания связаны между собой фосфатными группами, в каждой из которых содержится ионизированная гидроксильная группа. Поэтому возникающие в ДНК отрицательные заряды должны быть уравновешены эквивалентным количеством катионных групп. У эукариот это осуществляется путем ассоциации хромосомной ДНК с основными белками (гистонами). Однако в бактериальных клетках такие белки не встречаются. Нейтрализация заряда в них осуществляется полиаминами, а именно спермином и спермидином (см. гл. 9), а также ионами Mg^{2+} .

Полученная Кейрнсом радиоавтографическая картина кольцевой структуры бактериальной хромосомы выявляет также и способ ее репликации (рис. 11.55). Репликация на-

Рис. 11.57. Схема, иллюстрирующая модель репликации бактериальной хромосомы, предложенную Жакобом, Бреннером и Кузеном. А. Хромосома присоединяется к репликаторному участку на клеточной мембране, служащему

шарниром. Одна цепь ДНК разрывается. Б. 5'-конец разорванной цепи присоединяется к другому участку мембраны. В. Хромосома вращается против часовой стрелки относительно участка присоединения, в котором находится фермен-

тативный аппарат репликации. Вновь синтезированные цепи ДНК показаны пунктирными линиями. В результате локализованного синтеза мембраны (заштрихованная область) началось разделение участков присоединения. Г. Репликация завершена.



чинается в одной точке хромосомного кольца, из которой образовавшаяся репликативная вилка движется затем вдоль хромосомы до тех пор, пока не произойдет полного удвоения всей ее структуры. Процесс включает первоначальный разрыв одной цепи двойной спирали ДНК в точке инициации, сопровождающийся вращением и постепенным раскручиванием двойной спирали, как схематически показано на рис. 11.56.

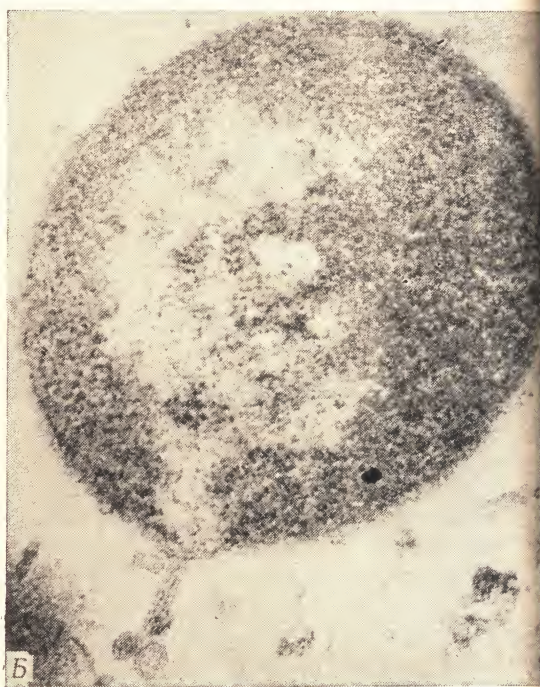
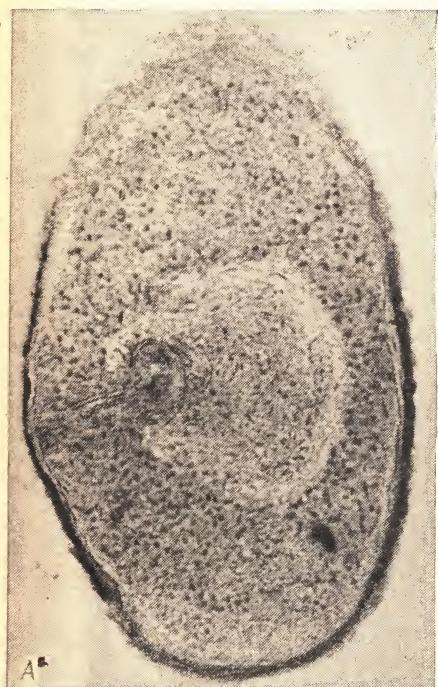
ГИПОТЕЗА РЕПЛИКОНА

В процессе роста бактерий делящиеся ядра постепенно расходятся, очевидно, без сколько-нибудь заметного изменения их формы (рис. 3.17). У эукариот разделение дочерних хромосом во время митоза происходит за счет их присоеди-

Рис. 11.58. Электронные микрофотографии ультратонких срезов бактериальных клеток, на которых видно, что ДНК присоединена к клеточной мембране. А. Клетка *B. subtilis*, в которой ДНК находится в контакте с мезосомой. [Ry-

ter A., Jacob F., Membrane et segregation nucleaire chez les bacteries, *Protides of the Biological Fluids*, 15, 267 (1967).] Б. Протопласт *B. subtilis*, полученный под действием лизоцима. Мезосома вытолкнута наружу, а ДНК

клетки подтянута к клеточной мембране в этой же точке. [Ryter A., Association of the nucleus and the membrane of bacteria: a morphological study, *Bacteriol. Rev.*, 32, 39 (1968).]



нения к микротрубочкам митотического аппарата, которые разводят их к полюсам веретена. Однако у прокариот подобного аппарата не существует. Как же тогда достигается разделение бактериальных хромосом после их репликации?

На основе наблюдений Кейрнса Жакоб, Бреннер и Кузэн (F. Jacob, S. Brenner, F. Cuzin) предложили в 1963 г. рабочую гипотезу, известную как *гипотеза репликона* (рис. 11.57). Эта гипотеза, претерпевшая небольшие модификации, до сих пор является, по-видимому, наиболее удовлетворительным объяснением событий, происходящих во время репликации и расхождения бактериальных хромосом. Ее основные положения можно суммировать следующим образом:

1. Когда начинается репликация, кольцевая хромосома
148 присоединяется в определенной точке к *репликаторному* уча-

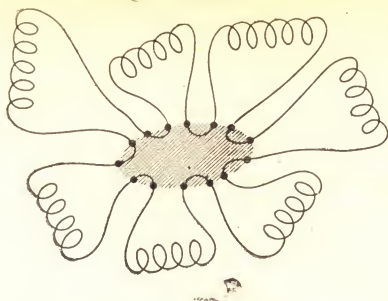


Рис. 11.59. Схема, иллюстрирующая предполагаемую структуру скрученной хромосомы *E. coli*. Хромосома представлена в виде семи петель, каждая из которых скручена в суперспираль (действительное их число значительно больше) и соединена с другими за счет сердцевины, состоящей из РНК (заштрихованная зона). [Worcel A., Burgi E., On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., 71, 127 (1972).]

стку на мембране бактериальной клетки. С этим участком связан ферментативный аппарат, ответственный за репликацию ДНК (см. гл. 7).

2. Репликативная вилка образуется в репликаторном участке и перемещается вдоль хромосомы, что вызывает движение хромосомы относительно точки присоединения.

3. Перед началом репликации на мембране формируется новый репликаторный центр, примыкающий к старому, к нему присоединяется свободный конец разорванной цепи ДНК.

4. Разделение дочерних хромосом осуществляется путем локального синтеза мембраны на участке, расположенном между старой и новой точками присоединения. В результате роста мембраны точки присоединения отодвигаются все дальше и дальше друг от друга.

Некоторые предсказания гипотезы репликона впоследствии подтвердились. Имеется большое количество электронно-микроскопических данных, указывающих на прямое присоединение хромосомы к мембране бактериальной клетки, как показывают примеры, представленные на рис. 11.58. Тесная связь между репликативной вилкой и мембраной была продемонстрирована путем кратковременного введения меченого тритием тимидина в ДНК *E. coli* непосредственно перед экстрагированием клеток. После экстракции фрагменты вновь синтезированной радиоактивной ДНК оказываются большей частью связанными с мембранными фрагментами. Наконец, ДНК-полимеразы в неочищенных бесклеточных экстрактах, по-видимому, также связаны с мембранной фракцией. Модель репликации хромосомы, приведенная на рис. 11.57, не учитывает, однако, недавно полученных данных о том, что репликация хромосомы *E. coli* в норме бывает двухсторонней, причем обе репликативные вилки движутся из одной точки инициации одновременно в противоположных направлениях (см. гл. 7). Пока не ясно, каким образом

Рис. 11.60. Электронная микрофотография скрученной хромосомы, выделенной из клетки *Escherichia coli*. Видно, что хромосома присоеди-

нена к фрагменту клеточной мембраны (темная область неправильной формы в центре снимка). [Delius H., Worcel A., Electron mic-

roscopic visualization of the folded chromosome of *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., 82, 107 (1974).]



это можно представить на схеме, изображенной на рис. 11.57, в связи с тем, что комплекс репликативных ферментов занимает фиксированное положение на мембране.

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЯДЕР

Если бы бактериальная хромосома представляла собой просто гигантскую кольцевую молекулу ДНК, свернутую случайным образом, то ее упорядоченная репликация и сегрегация были бы невозможны, поэтому хромосоме должна быть присуща определенная организация на более высоком уровне. Проведенные в последнее время работы по выделению структур, являющихся, по-видимому, интактными бактериальными ядрами, проливают свет на природу такой организации. Эти структуры были получены в результате мягкого лизиса бактерий, обработанных лизоцимом в присутствии неионных детергентов в 1,0 М растворе NaCl. Кроме ДНК в них содержатся заметные количества РНК и белка. Они быстро осаждаются и обладают низкой вязкостью (в отличие от развернутой ДНК высокого молекулярного веса, обладающей высокой вязкостью).

В зависимости от условий лизиса можно получить два типа таких структур. Лизис при 25 °C дает структуры с коэффициентами седиментации от 1300 до 2200 S, они, по-

видимому, представляют собой свернутые хромосомы, связанные со значительным количеством РНК и белка. Белок — это в основном РНК-полимераза, а РНК — вновь образованные одноцепочечные РНК. Обработка препарата РНКазой вызывает быстрое увеличение его вязкости, свидетельствующее о том, что часть ассоциированной РНК ответственна за поддержание компактной формы ДНК. ДНК в этих структурах свернута в сверхспирализованные петли, число которых может варьировать от 12 до 80. В свете этих фактов свернутую хромосому можно представить в схематичном виде так, как это показано на рис. 11.59.

Если лизис проводят при низкой температуре (0—4 °C), то получаются структуры с более высокими скоростями седиментации (3000—4000 S). Электронно-микроскопические исследования показывают (рис. 11.60), что они состоят из свернутых хромосом, присоединенных к одному или двум мембранным фрагментам, от которых их можно отделить мягкой обработкой. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что связывание хромосомы с мембраной осуществляется с помощью очень слабых сил. Никаких связанных с мембраной свернутых хромосом не удается выделить из клеток, завершивших цикл репликации ДНК. Таким образом, *in vivo* покоящаяся хромосома, вероятно, не связана с мембраной, так как присоединение к мембране является подготовительным этапом к следующему циклу репликации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

Leive L. (ed.), 1973, *Bacterial Membranes and Walls*, New York, Marcel Dekker.

Обзоры и оригинальные работы

- Adler J. (1966), *Chemotaxis in Bacteria*, Science, **153**, 708.
 Cairns J. (1963), The Bacterial Chromosome and Its Manner of Replication as Seen by Autoradiography, J. Mol. Biol., **6**, 208.
 Cohen-Bazire G., 1971, The Photosynthetic Apparatus of Prokaryotic Organisms, in *Biological Ultrastructure: The Origin of Cell Organelles*, P. Harris (ed.), Corvallis, Oregon State University Press.
 Cruden D. L., Stanier R. Y. (1970), The Characterization of Chlorobium Vesicles and Membranes from Green Bacteria, Arch. Mikrobiol., **72**, 115.
 Dawes E. A., Senior P. J. (1973), The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Microorganisms, Advan. Microbiol. Physiol., **10**, 136.
 Jacob F., Brenner S., Cuzin F. (1963), On the Regulation of DNA Replication in Bacteria, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **28**, 329.
 Képès A., Autissier F. (1972), Topology of Membrane Growth in Bacteria, Biochem. Biophys. Acta, **265**, 443.
 MacNab R. M., Koshland D. E. (1972), The Gradient-Sensing Mechanism in Bacterial Chemotaxis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **69**, 2509.
 Schleifer K. H., Kandler O. (1972), Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications, Bact. Revs., **36**, 407.
 Shiveley J. M. (1974), Inclusion Bodies of Prokaryotes, Ann. Rev. Microbiol., **28**, 167.

- Shiveley J. M., Ball F., Brown D. H., Saunders R. E. (1973), Functional Organelles in Prokaryotes: Polyhedral Inclusions (Carboxysomes) of *Thiobacillus neapolitanus*, *Science*, **182**, 584.
- Simon R. D. (1971), Cyanophycin Granules from the Blue-Green Alga *Anabaena cylindrica*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 265.
- Sutherland I. W. (1972), Bacterial Exopolysaccharides, *Advan. Microbiol. Physiol.*, **8**, 143.
- Walsby A. E. (1972), Structure and Function of Gas Vacuoles, *Bact. Revs.*, **36**, 1.
- Worcel A., Burgi E. (1972), On the Structure of the Folded Chromosome of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **81**, 127.

Задолго до открытия мира микробов «вирусом» называли любой болезнетворный агент. Это — латинское слово, и исходно оно означало «яд», «отрава». До тех пор пока в XIX в. не были выявлены специфические микробные болезнетворные агенты, представления о причинах инфекционных болезней были неопределенными и абстрактными. На заре микробиологии все эти микробные агенты, будь то бактерии, грибы или простейшие, часто огульно называли «вирусами». В настоящее время в таком широком смысле этот термин уже не используется.

ОТКРЫТИЕ ФИЛЬТРУЮЩИХСЯ ВИРУСОВ

В 1892 г. Д. Я. Ивановский обнаружил, что экстракт из пораженных мозаикой растений табака сохраняет инфекционность, даже если его профильтровать через задерживающий бактерии фильтр. Он предположил, что инфекционным агентом в этом случае является какой-то мелкий микроорганизм. В течение следующих двух-трех десятилетий выяснилось, что многие распространенные болезни растений и животных вызываются сходными инфекционными агентами, которые настолько малы, что их нельзя увидеть в световой микроскоп. Основным свойством, отличающим эти формы от более привычных болезнетворных микробов, была их способность проходить через фильтры с такими порами, которые задерживали даже очень мелкие бактерии. Поэтому все подобные агенты в совокупности были названы «фильтрующимися вирусами». Со временем прилагательное «фильтрующийся» отпало, а слово *вирус* стало *специфическим* обозначением группы ультрамикроскопических инфекционных агентов, которые проходят через фильтр.

Большинство ученых, занимавшихся изучением вирусов в первые десятилетия XX в., считали, что они отличаются от более привычных типов микробов лишь размерами, а не какими-то фундаментальными биологическими свойствами. При исследовании поведения вирусов в лабораторных условиях был сделан вывод, что все они являются *облигатными внутриклеточными паразитами*, которые способны размножаться лишь внутри клетки-хозяина. Однако облигатный внутриклеточный паразитизм нельзя считать отличительным признаком вирусов, поскольку он характерен также и для

Вскоре после того как Ивановский открыл фильтруемость вируса табачной мозаики, были получены первые данные о том, что вирусы по своей *природе* могут отличаться от клеточных организмов. Подтверждая данные Ивановского, М. Бейеринк (M. W. Beijerinck) обнаружил, что вирус табачной мозаики осаждается спиртом и при этом не утрачивает своей инфекционности. Кроме того, он обнаружил, что этот вирус может диффундировать через агаровый гель. Живые организмы никогда не проявляли таких свойств, и поэтому, не считая вирус живым организмом, Бейеринк пришел к выводу, что он представляет собой «жидкий носитель инфекционности». Это блестящее предвидение подтвердилось, однако, лишь спустя примерно 40 лет. В 1935 г. В. Стенли (W. M. Stanley) показал, что инфекционные частицы этого же вируса можно закристаллизовать и что образующиеся кристаллы состоят в основном из белка. Исходя из этого, был сделан вывод, что вирус представляет собой белковую молекулу. Однако это первое предположение оказалось сильно упрощенным. Несколькими годами позднее обнаружили, что очищенный вирус табачной мозаики содержит также постоянное, хотя и намного меньшее по сравнению с белком, количество рибонуклеиновой кислоты. Следовательно, инфекционная частица вируса представляет собой не белковую молекулу, а молекулярный комплекс, построенный из макромолекул двух разных типов: белка и нуклеиновой кислоты. Для каждого вируса специфичен определенный тип нуклеиновой кислоты. Это может быть либо ДНК, либо РНК.

Первые описанные вирусы были возбудителями болезней высших растений или животных. Примерно в 1915 г. Ф. Творт (F. W. Twort) и Ф. д'Эрель (F. d'Herelle) независимо друг от друга открыли, что бактерии чувствительны к заражению ультрамикроскопическими фильтрующимися агентами, которые были названы *бактериофагами* (т. е. пожирателями бактерий). Часто их сокращенно называют просто *фагами*. Вскоре д'Эрель подчеркнул, что между бактериофагами и вирусами растений и животных существует фундаментальное сходство, но настоящими вирусами бактериофаги были признаны лишь спустя некоторое время.

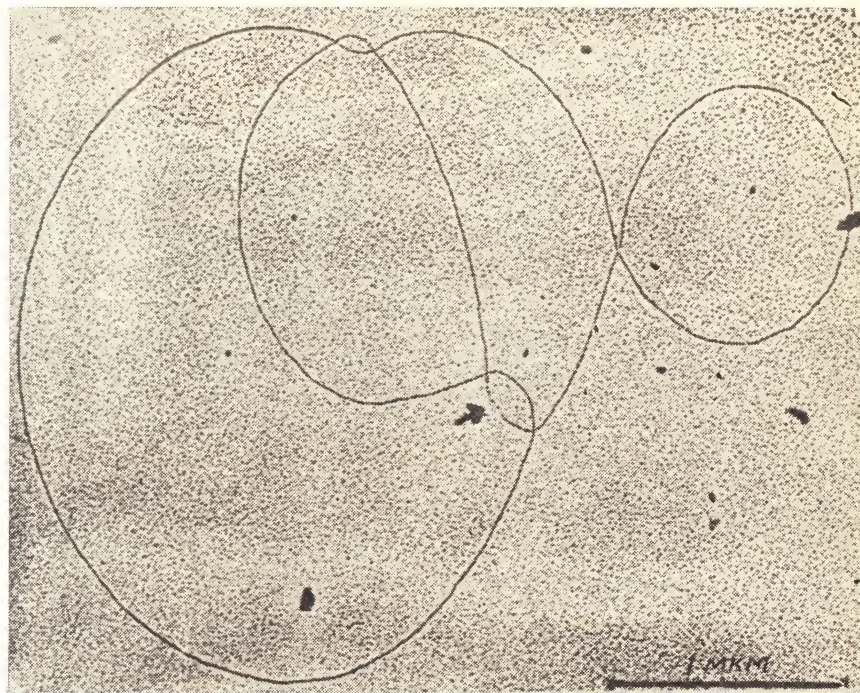
ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ

В жизненном цикле вирусов чередуются две фазы — *внеклеточная* и *внутриклеточная*. Во время *внеклеточной* фазы вирус существует в виде инертной инфекционной частицы — *вириона*. Вирион состоит из одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты (либо ДНК, либо РНК), которая заключена в белковую оболочку, называемую *капсидом*. В свою очередь этот «нуклеокапсид» может быть заключен, как у некоторых вирусов животных, в особую *оболочку* (мембрану).

Рис. 12.1. ДНК фага λ .
Длина молекулы равна
16,3 мкм. Стрелкой ука-
зан разрыв, где находят-

ся «липкие концы».
[Ris H., Chandler B. L.,
The ultrastructure of
genetic systems in pro-

karyotes and eukaryotes,
Cold Spring Harbor
Symp. Quant. Biol., 28,
1 (1963).]



Во время *внутриклеточной* фазы вирус существует в виде реплицирующейся молекулы нуклеиновой кислоты, опять-таки либо ДНК, либо РНК, и генетический материал вируса не только реплицируется в клетке-хозяине, но и служит генетическим детерминантом для синтеза клеткой специфических *вирусных белков*. Эти белки включают и те *субъединицы (капсомеры)*, из которых собирается капсид зрелой вирусной частицы.

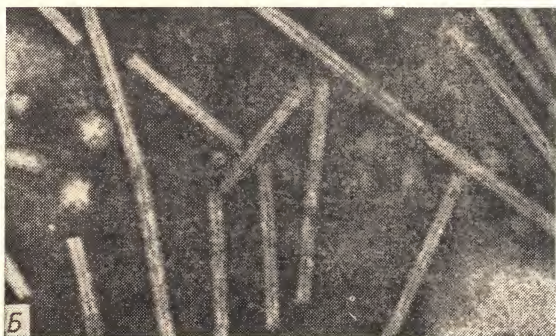
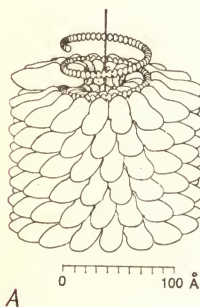
НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА ЗРЕЛОГО ВИРИОНА

Зрелый вирион содержит *нуклеиновую кислоту только одного типа*, хотя тип этот у разных вирусов может быть различен. Большинство вирусов содержит либо двухцепочечную ДНК, либо одноцепочечную РНК, но в ряде вирусов содержится одноцепочечная ДНК (например, в колифагах fd и ϕ X174 и в мелком вирусе мыши), а в вирионах реовирусов и некоторых вирусов растений — двухцепочечная РНК.

Рис. 12.2. А. Схематическое изображение структуры вириона вируса табачной мозаики. Для ясности часть цепи РНК показана без поддерживающего ее белкового скелета. [Klug A., Cas-

par D. C. D., The structure of small viruses, Adv. Virus Res., 1, 225 (1960). Б. Электронная микрофотография частиц вируса табачной мозаики, контрастированных фосфовольфрамовой кис-

лотой. [Brenner S., Horne R. W., A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses, Biochim. Biophys. Acta, 34, 103 (1959). С любезного разрешения Р. Хорна.]



Если при выделении из вирионов нуклеиновой кислоты вести до минимума вероятность ее разрыва под действием гидродинамических сил, то можно обнаружить, что каждый вирион (за исключением крупных РНК-содержащих вирусов) содержит *одну-единственную молекулу нуклеиновой кислоты*. Длина такой молекулы для каждого данного вируса постоянна, но у разных вирусов варьирует от нескольких тысяч до 250 000 нуклеотидов (или нуклеотидных пар). Если принять, что средний размер гена составляет 1000 нуклеотидов (см. гл. 13), то самые мелкие вирусы содержат менее 10, а самые крупные — несколько сот генов.

Молекула ДНК некоторых вирусов бактерий и животных кольцевая (рис. 12.1). Вирионы других ДНК-содержащих вирусов и вирионы всех РНК-содержащих вирусов содержат линейные молекулы нуклеиновой кислоты. Молекула ДНК вириона бактериофага λ линейна, но сразу после проникновения в клетку-хозяина она превращается в кольцевую (см. рис. 12.16). Кольцевая замкнутая структура характерна также для хромосом бактерий (например, для хромосомы *Escherichia coli*) и для плазмид — вирусоподобных генетических элементов, обнаруженных в бактериях (см. гл. 15).

Репликация различных типов вирусных нуклеиновых кислот будет рассмотрена ниже.

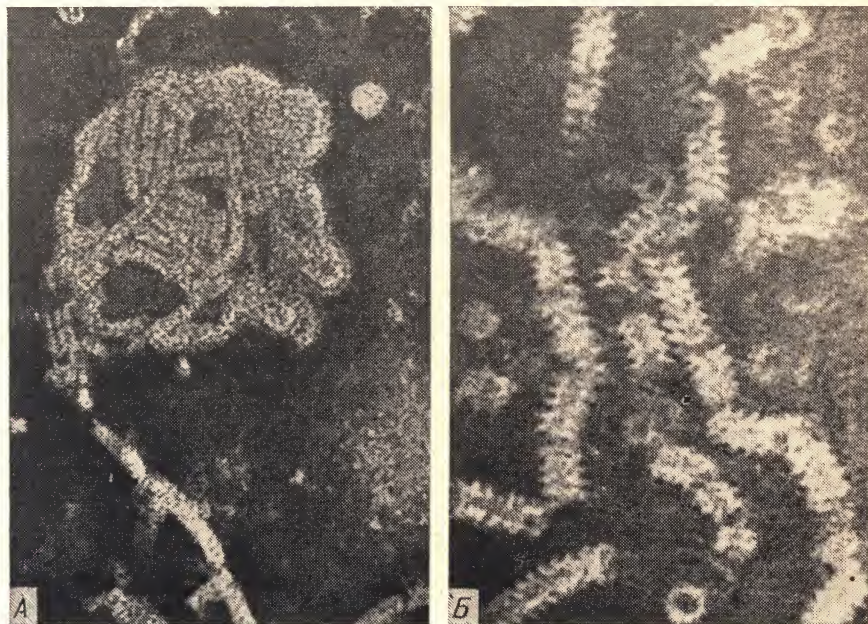
СТРОЕНИЕ НУКЛЕОКАПСИДА

По строению нуклеокапсидов большинство вирусов можно разделить на два класса — они бывают либо спиральными, либо полиэдрическими. Эти основные структуры могут быть

Рис. 12.3. Нуклеокапсиды вирусов, обладающих оболочкой. А. Частично разрушенная частица вируса ньюкастльской болезни, из которой высвобождалась содержащаяся внутри нее

структура (нуклеокапсид). Б. Электронная микрофотография нуклеокапсида, высвободившегося из вируса свинки; при большом увеличении. [Horne R. W. et al., The structure and

composition of myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques, Virology, 11, 79 (1960).]



далее модифицированы. У многих бактериофагов полиэдрическая головка соединена со спирально организованным хвостовым отростком, а у многих вирусов животных нуклеокапсид заключен в особую оболочку (мембрану). Обнаружено, что мембраной окружены и вирионы одного из бактериофагов — ДНК-содержащего фага, который развивается в морской псевдомонаде. Содержащие липиды оболочки таких вирусов образуются из мембран клеток-хозяев.

Из вирионов со спиральной структурой лучше всего изучен вирион вируса табачной мозаики (рис. 12.2). В нем молекула одноцепочечной РНК расположена в желобке, который образован в спиральном капсиде. Полный вирион имеет палочковидную форму и содержит примерно 2000 идентичных капсомеров. Строение вириона вируса табачной мозаики типично для многих вирусов растений. У ряда вирусов животных также имеются спиральные нуклеокапсиды, но они всегда уложены внутри оболочки беспорядочно. Некоторые из них представлены на рис. 12.3.



Рис. 12.4. Вирион аденовируса. Видна икосаэдрическая организация капсомеров. Расположенные в вершинах капсомеры соседствуют с пятью, а все другие — с шестью капсомерами. [Valentine R. C., Pereira H. G., *Antigens and structure of the adenovirus*, J. Mol. Biol., 13, 13 (1965).]

В полиэдрических вирионах молекула нуклеиновой кислоты упакована внутри полой полиэдрической головки, однако способ упаковки остается пока неизвестным. Капсиды многих полиэдрических вирусов животных и растений представляют собой икосаэдры — правильные многогранники с 12 вершинами, 20 треугольными гранями и 30 ребрами.

Капсид такого вириона состоит из капсомеров двух типов: пентамеров, расположенных в вершинах, и гексамеров, которые заполняют треугольные грани (рис. 12.4). Каждый капсомер представляет собой мультимерный белок, причем пентамер содержит пять, а гексамер — шесть идентичных субъединиц. Субъединица может быть образована одной-единственной полипептидной цепью. Однако по крайней мере в одном случае было обнаружено, что субъединица содержит две разные полипептидные цепи.

Размер икосаэдрического вируса определяется числом содержащихся в нем капсомеров, определяемым законами кристаллографии: икосаэдрическая структура может быть образована только определенным числом капсомеров. Например, наименьший возможный икосаэдрический капсид должен иметь 12 пентамеров и не содержать гексамеров. Следующий по величине капсид должен состоять из 12 пентамеров и 20 гексамеров и т. д. Самый крупный из известных икосаэдрических вирионов — вирион одного из вирусов насекомых — содержит 1472 капсомера.

ОБОЛОЧКА

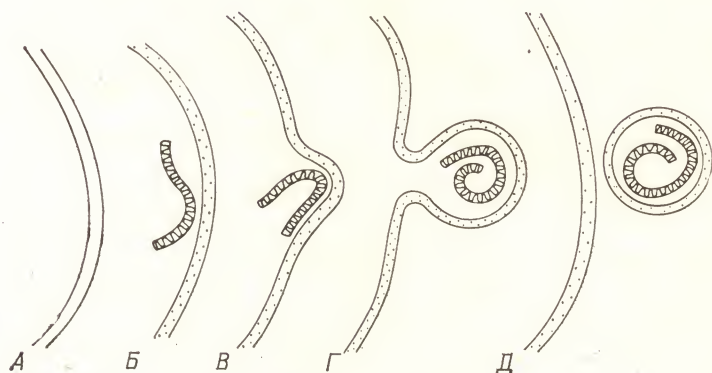
НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Ряд вирусов животных формируется в клетке-хозяине путем «почкования», при котором нуклеокапсид окружается слоем клеточной мембраны, как это показано на рис. 12.5. Однако оболочка вируса содержит не только нормальные клеточные

Рис. 12.5. А—Д. Схематическое изображение процесса высвобождения из клетки вируса, обладающего оболочкой. Точками изображены новые белки мембраны, которые кодируются генами вируса. (Из книги Davis B. et al., Microbiology, New York, Harper

and Row, 1967, с изменениями.) Е. Электронная микрофотография тонкого среза животной клетки, из которой высвобождаются частицы вируса гриппа. Препарат обработан антителами против вирионов гриппа. Молекулы антител связаны с ферритином,

который содержит атомы железа и потому является электроноплотным. [Morgan C. et al., The application of ferritin-conjugated antibody to electron microscopic studies of influenza virus in infected cells, J. Exptl. Med., 114, 825 (1961).]



компоненты; во многих случаях в нее входят также белки, которые кодируются генами вируса. Сформировавшаяся оболочка часто представляет собой сложную, высокоорганизованную структуру, состоящую из нескольких слоев (рис. 12.6).

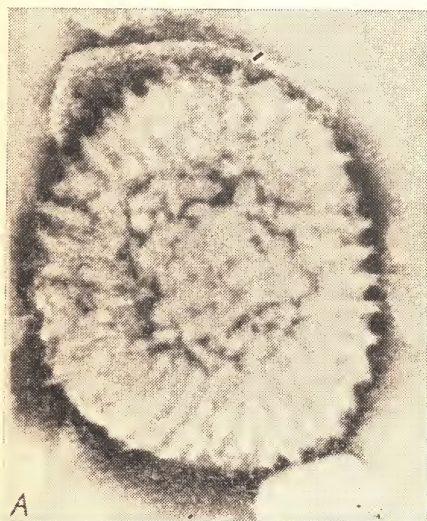
РАЗМНОЖЕНИЕ ВИРУСОВ

Процесс размножения вирусов можно подразделить на пять стадий: проникновение в клетку-хозяина, синтез ферментов, которые необходимы для репликации вирусной нуклеиновой кислоты, синтез составных частей вируса, сборка их с образованием зрелых вирионов и выход зрелых вирионов из клетки-хозяина.

Рис. 12.6. А. Полная частица вируса осповакцины, негативно контрастированная фосфовольфрамовой кислотой. Различимые на поверхности вириона гребешки могут быть длинными палочками или трубочками. Б. Негативно контрастированная частица вируса

осповакцины после центрифугирования в сахарозном градиенте. В результате частичного разрушения частица утратила наружную мембрану. Оставшаяся структура включает двояковогнутое внутреннее ядро, содержащее нуклеиновую кислоту, два

эллиптических тела и окружающую всю эту структуру мембрану. [Dales S., The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid, J. Cell. Biol., 18, 51 (1963).]



Процессы проникновения вируса в клетку различны у вирусов бактерий, растений и животных. Вирусы бактерий и растений должны пройти через клеточную стенку, тогда как вирусы животных могут адсорбироваться непосредственно на мембране клетки-хозяина. Некоторые, но не все вирусы бактерий проходят сквозь клеточную стенку путем инъекции. В этом случае белковая оболочка вируса остается адсорбированной снаружи клетки, а нуклеиновая кислота впрыскивается через стенку внутрь клетки. Вирусы растений, однако, не обладают специальным аппаратом для преодоления клеточной стенки и поэтому в эксперименте для заражения необходимо механически повредить растительные клетки. В природе вирусы растений обычно передаются от одного растения-хозяина к другому с помощью переносчиков. Такими переносчиками могут служить насекомые, которые инъецируют частицы вируса через клеточные стенки растения.

Вирусы животных адсорбируются на мембране клетки-хозяина и могут попасть внутрь клетки путем фагоцитоза. Поглощенный в результате фагоцитоза вирион оказывается

заклученным в пищевую вакуоль, окруженную мембраной (см. рис. 29.4). Чтобы попасть в цитоплазму или ядро, где он и будет размножаться, вирус должен еще пройти через клеточную мембрану. Если вирус обладает оболочкой, которая частично ведет свое происхождение от мембраны предыдущей клетки-хозяина, то его проникновение облегчается за счет слияния оболочки вируса с мембраной новой клетки-хозяина (с помощью процесса, приблизительно обратного тому, который изображен на рис. 12.5). В случае лишенных оболочки вирусов, в том числе и фатов, механизм проникновения нуклеокапсида через мембрану клетки до сих пор неизвестен.

У большинства вирусов бактерий до цитоплазмы клетки-хозяина доходит лишь нуклеиновая кислота вируса. Однако в случае вирусов растений и животных в цитоплазму может проникать весь нуклеокапсид, и процесс проникновения завершается удалением белкового капсида, что происходит, вероятно, под действием протеолитических ферментов. Таким образом, процесс проникновения вируса в клетку завершается появлением внутри клетки свободной нуклеиновой кислоты вируса.

Появление внутри клетки-хозяина свободной вирусной нуклеиновой кислоты запускает два разных процесса: синтез вирус-специфических белков и репликацию самой вирусной нуклеиновой кислоты. Если нуклеиновой кислотой является РНК, то информационной РНК служит либо непосредственно она сама, либо транскрибируемая на ней информационная цепь РНК противоположной полярности. Если же вирусной нуклеиновой кислотой является ДНК, то сначала на ней с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы транскрибируется вирусная информационная РНК. В обоих случаях вирусная информационная РНК транслируется рибосомами клетки-хозяина и образуются как ферменты, необходимые для репликации вируса, так и субъединицы капсида.

Молекула вирусной нуклеиновой кислоты служит матрицей для своей собственной репликации, причем синтез комплементарной цепи осуществляется специфическими полимеразми. Однако детали механизма репликации различны в зависимости от природы нуклеиновой кислоты, от того — ДНК это или РНК, одно- или двухцепочечная, кольцевая или линейная молекула. Некоторые способы репликации мы рассмотрим в конце главы.

В ходе синтеза белков и репликации в клетке-хозяине накапливается большое число молекул вирусной нуклеиновой кислоты и субъединиц вирусного капсида. Они спонтанно соединяются друг с другом, образуя полные нуклеокапсиды. Процесс размножения вируса завершается выходом из клетки-хозяина зрелых вирионов. В клетках животных этот процесс часто завершается выходом вируса через мембрану

клетки, а у бактерий он обычно оканчивается лизисом клетки-хозяина под действием индуцируемого вирусом фермента.

ИНФЕКЦИОННАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА

Как мы видели, проникновение в цитоплазму клетки-хозяина свободной вирусной нуклеиновой кислоты приводит к синтезу зрелых вирионов. Действительно, клетку-хозяина можно заразить свободной нуклеиновой кислотой, выделенной из вирионов. Однако *эффективность* такой инфекции составляет обычно всего от одной тысячной до одной миллионной эффективности заражения интактным вирионом. Таким образом, капсид облегчает проникновение вируса в клетку, снабжая его механизмом для *адсорбции* на поверхности клетки-хозяина, а в случае некоторых бактериофагов — еще и механизмом для инъекции нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Капсид может также предохранять нуклеиновую кислоту вируса от деградации, когда он находится вне клетки.

Специфичность вируса в отношении круга хозяев определяется в основном специфичностью его взаимодействия с рецепторными участками на поверхности клетки-хозяина. В это взаимодействие вовлечены специфические участки для адсорбции, расположенные на поверхности вирусного капсида, и поэтому круг хозяев для свободной нуклеиновой кислоты вируса гораздо шире, чем для интактного вириона. Однако низкая эффективность инфекции свободной нуклеиновой кислотой препятствует расширению спектра хозяев в природных условиях.

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ВИРУСАМИ И КЛЕТОЧНЫМИ ОРГАНИЗМАМИ

Из сказанного выше ясно, что вирусы составляют уникальный класс биологических объектов, отличный от клеточных организмов. Различия между вирусами и клетками можно суммировать следующим образом:

1. Во время внеклеточной фазы, в виде вириона, вирус состоит из нуклеиновой кислоты одного типа, ДНК или РНК, которая связана с белковым капсидом. Вирион может содержать один или несколько ферментов, принимающих участие в начальных стадиях инфекции, но набор ферментов в вирионе далеко не достаточен для его размножения. Наоборот, клетка всегда содержит и ДНК, и РНК, и сложный набор ферментов, способных проводить все те реакции, которые необходимы для воспроизведения.

2. Вирусное потомство образуется в результате сборки синтезированных клеткой-хозяином независимо друг от друга копий вирусной нуклеиновой кислоты и субъединиц капсида. Рост клетки, напротив, состоит в том, что упорядоченным образом увеличивается количество каждой из ее составных частей, и в течение этого процесса постоянно поддерживает-

ся ее целостность. Таким образом, вирион никогда не возникает непосредственно из предшествовавшего вириона, тогда как клетка всегда получается из клетки. Рост клеток завершается делением, т. е. увеличением их числа.

Итак, ясно, что по своей природе размножение вирусов и рост и деление клеток в корне различны. Одно время считали, что некоторые инфекционные агенты, располагающиеся по своим размерам между типичными клетками и типичными вирусами, соответственно и относятся к промежуточным формам жизни. Однако на основании перечисленных выше критериев эти агенты можно теперь отнести безоговорочно в одних случаях к клеточным организмам, а в других — к истинным вирусам. Например, *Chlamydozoaceae* (возбудители пситтакоза, венерической лимфогрануломы и трахомы) явно представляют собой клеточные организмы, а имеющие такие же размеры возбудители коровьей и натуральной оспы, несомненно, являются вирусами.

КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Наиболее широко используемая система классификации вирусов приведена в табл. 12.1. В соответствии с этой системой, которая была предложена в 1962 г. А. Львовым (А. Lwoff) с сотрудниками, классификация вирусов проводится на основании свойств вирионов: типа нуклеиновой кислоты, строения капсида, наличия или отсутствия оболочки и размера капсида. При дальнейшем подразделении учитываются уже другие свойства вириона, такие, как число цепей в молекуле нуклеиновой кислоты (одна или две), особенности развития вируса (например, локализация синтеза вируса в клетке) и особенности взаимодействия вируса с хозяином (например, круг хозяев).

Эта система не связана с природной, филогенетической классификацией. Она и не пытается выявлять совершенно неизвестные нам эволюционные связи между вирусами. Вместо этого вирусы группируются в соответствии с их общими химическими свойствами или особенностями их строения, т. е. в соответствии с теми свойствами, которые неизменно присущи им и которые можно точно определить.

Следует отметить, что при такой классификации круг хозяев играет лишь незначительную роль. Но поскольку методы, которые используются при изучении вирусов, развивающихся на разных хозяевах, сильно различаются, практически вирусы группируются в соответствии с тем, кто является их естественными хозяевами — бактериями, животными или растениями¹.

¹ Долгое время считали, что среди микроорганизмов хозяевами для вирусов могут быть только бактерии. Однако недавно вирусы были обнаружены у некоторых грибов; имеются сообщения о существовании частиц, похожих на вирионы, у некоторых видов простейших.

ТАБЛИЦА 12.1
КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Нуклеиновая кислота	Симметрия капсида	Наличие оболочки	Размер капсида, Å	Число капсомеров	Особые свойства			Примеры вирусов	
								бактерий	животных растений
РНК	Спиральная	Нет	175×3000						Вирус табачной мозаики
		Есть	90 180						
	Полиэдрическая	Нет	200—250 280	32			Колифаг f2	Миксовирусы Парамиксовирусы	
ДНК	Спиральная	»	700	92	Двухцепочечная РНК			Пикорнавирусы	Вирус кукурузной карликовости
		Есть	50×8000		Одноцепочечная ДНК		Колифаг fd	Реовирусы	
	Полиэдрическая	Нет	90—100 220	12	Одноцепочечная ДНК		Колифаг ØX174	Поксвирусы	
		Есть	450—500 600—900	72 252 162				Паповавирусы Аденовирусы Герпесвирусы	
	Двойная (полиэдрические головки», спиральные «хвостовые отростки»)	Нет	Головка: 950×650 Отросток: 170×1150				Колифаги T2, T4, T6		

1 В случае полиэдрических вирионов — диаметр.

ВИРОИДЫ

Многие болезни растений вызываются трансмиссивными агентами, которые по размерам гораздо мельче любого известного вируса. Показано, что эти агенты, названные *виридами*, представляют собой очень небольшие молекулы РНК. Мол. вес их, судя по оценкам, варьирует от 75 000 до 100 000. Они не обладают капсидами и передаются «горизонтально» от растения к растению, по-видимому, чисто механическим путем, а «вертикально» — через пыльцу или семяпочку. Влияют ли они непосредственно на функции хозяина, или участие в этом принимают транслируемые на этих РНК полипептиды — пока неизвестно. Ничего не известно также и о способе их репликации.

Вопрос о существовании виридов в клетках животных до сих пор остается открытым. Если даже такие вирусы существуют, то неясно, являются ли они этиологическими агентами тех болезней, которые, как считают, вызываются вирусами, но возбудители которых до сих пор не выявлены.

ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ

Почти каждый известный в настоящее время вид бактерий, как оказалось, является хозяином для одного или нескольких вирусов (бактериофагов). Однако большинство исследований в этой области проведено на фагах, которые развиваются в клетках *Escherichia coli*, поэтому мы ограничимся рассмотрением в основном тех результатов, которые получены на этой группе фагов.

В вирионах большинства ДНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота двухцепочечная, но в некоторых случаях ДНК бывает и одноцепочечной. В вирионах всех известных РНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота одноцепочечная. У всех фагов, за исключением одной группы, нуклеиновая кислота заключена в полиэдрический капсид. Во многих случаях такой капсид соединен со спиральной белковой структурой, «хвостовым отростком», который служит органом адсорбции. Исключение составляют нитевидные фаги, типичным представителем которых является фаг fd. Этот фаг имеет палочковидную структуру и содержит одноцепочечную ДНК. Вирионы некоторых фагов показаны на рис. 12.7 и 12.11.

ВЫЯВЛЕНИЕ ФАГОВЫХ ЧАСТИЦ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ КОЛИЧЕСТВА

Если к растущей в жидкой среде культуре чувствительных бактерий добавить в небольшом количестве частицы вирусного бактериофага, то некоторые бактериальные клетки
165 окажутся зараженными. В течение некоторого времени ни-

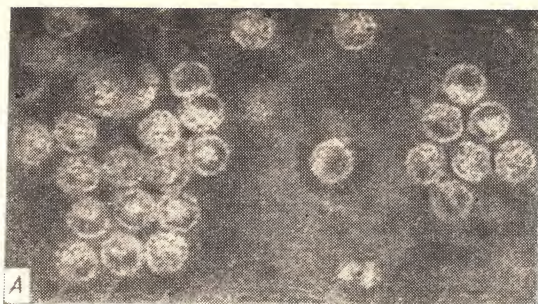


Рис. 12.7. Икосаэдрический (А) и нитевидный (Б) (со спиральной симметрией) вирионы бактериофагов. [Bradley D. E., The structure of some bacteriophages associated with male strains of *Escherichia coli*, J. Gen. Microbiol., 35, 471 (1964).]

каких видимых изменений зараженных клеток обнаружить нельзя. Обычно этот период продолжается от 15 мин до 1 ч, а иногда и более, и длительность его зависит от природы фага и бактерии и от условий культивирования. Затем внезапно происходит *лизис* зараженных клеток. При лизисе зараженной клетки высвобождается большое количество новых фаговых частиц потомства. Эти частицы могут в свою очередь заражать другие клетки популяции, и при этом вновь повторяется тот же самый процесс. Следовательно, если в культуру внести даже небольшое по сравнению с количеством бактериальных клеток число инфекционных фаговых частиц, то через несколько часов практически вся популяция бактерий будет уничтожена.

Число фаговых частиц или зараженных бактериальных клеток в суспензии легко определить, если подходящее разведение этой суспензии нанести на чашку с агаром, на поверхность которого равномерно нанесена разбавленная суспензия чувствительных бактерий. После соответствующей инкубации вся поверхность чашки будет покрыта сплошным слоем бактерий, за исключением тех мест, где оказались частицы фага или зараженные клетки. В результате последовательных циклов развития фага пленка бактерий вокруг таких точек локально разрушается и образуются прозрачные зоны лизиса — *бляшки* (рис. 12.8). Если имеется смесь зараженных клеток и свободных фаговых частиц, то с помощью соответствующих методов их можно разделить (используя, например, дифференциальное центрифугирование) и затем с помощью описанного метода *подсчета бляшек* оп-

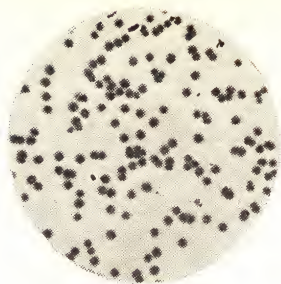


Рис. 12.8. Бляшки, обработанные фагом T2.
(С любезного разрешения Г. Стента.)

ределить по отдельности число тех и других. Если нужно определить лишь число фаговых частиц, содержащихся в суспензии, то можно избирательно убить присутствующие в ней зараженные клетки. Обычно для этого суспензию клеток и фага встряхивают с хлороформом, к которому бактериофаги устойчивы.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БАКТЕРИОФАГОВ

Метод подсчета числа бляшек может быть использован для выделения тех фагов, которые способны развиваться в определенных видах или штаммах бактерий. Для этого пробу материала из природного местообитания такой бактерии встряхивают с водой, освобождают эту суспензию от бактерий, пропуская ее через мембранный фильтр или обрабатывая хлороформом; аликвоты смешивают с суспензией данной бактерии и высевают на чашки с агаром. Любая бляшка, которая выявляется на чашках, соответствует присутствовавшей в природном материале фаговой частице. Фаг из отдельной бляшки можно выделить, прикоснувшись к ней стерильной иглой и суспендировав прилипший к игле материал в небольшом объеме стерильного раствора. Обычно в такой суспензии оказывается от 10^4 до 10^6 фаговых частиц. Затем проводят очистку фага, последовательно повторяя такое выделение из отдельной бляшки.

Для получения больших количеств фага для химического или физического исследования заражают фагом экспоненциально растущую в жидкой среде культуру бактерий. В результате ряда циклов развития фага большинство, а иногда и все клетки культуры лизируются. Затем оставшиеся в культуре клетки и их обломки удаляют с помощью низкоскоростного центрифугирования, а получившуюся жидкость стерилизуют либо фильтрованием, либо обрабатывая ее хлороформом. В результате получается *стерильный лизат*, который содержит обычно от 10^9 до 10^{12} фаговых частиц на 1 мл, а также растворимый материал и фракцию частиц, которые освобождаются из клеток при лизисе.

Для окончательной очистки бактериофагов обычно используют ультрацентрифугирование. Даже самые мелкие фаговые частицы осаждаются при ускорениях порядка 100 000 g (в 10^5 раз превышающих ускорение под действием земного притяжения). Часто предварительно вирусные частицы осаждают сульфатом аммония или некоторыми другими веществами.

ДНК-СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИОФАГИ: ЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ ИНФЕКЦИИ

Основные черты литического цикла инфекции выявляются в количественном опыте, известном как *одиночный цикл развития*. Для этого культуру чувствительных бактерий смешивают с суспензией фаговых частиц и проводят кратковременную инкубацию, чтобы позволить частицам фага адсорбироваться на бактериальных клетках. Если бактерии берутся в большом избытке, то почти все фаговые частицы оказываются адсорбированными. Затем культуру сильно разводят и продолжают инкубировать ее. При этом определяют число фаговых частиц и зараженных бактерий в культуре, периодически высевая пробы и подсчитывая число образующихся бляшек. Типичный результат такого опыта приведен на рис. 12.9. В течение некоторого времени после заражения число бляшек остается постоянным, так как каждая зараженная бактерия образует на чашке лишь одну бляшку независимо от того, сколько фаговых частиц содержала она в момент посева. Этот период называется *латентным*. Латентный период внезапно кончается, и зараженные клетки начинают лизироваться, высвобождая частицы фагового потомства. Число бляшек в этот момент быстро растет, и это продолжается до тех пор, пока не окажутся лизированными все зараженные клетки. Этот период называется *периодом лизиса*. После завершения лизиса число образующихся бляшек остается более или менее постоянным даже в том случае, если в популяции остались незараженные клетки, так как проведенное в начале опыта разведение культуры препятствует адсорбции высвободившихся при лизисе фаговых частиц на тех бактериях, которые остались незараженными. Среднее число новых фаговых частиц, высвобождающихся из одной зараженной клетки, называется *выходом* или *урожаем*. В опытах такого типа выход составляет обычно около 150, но может сильно варьировать в зависимости от используемой системы фаг — хозяин и от условий опыта.

Рассмотрим теперь подробнее те события, которые происходят в течение литического цикла инфекции. Наше изложение будет базироваться в основном на результатах опытов, проведенных с небольшой группой фагов, которые развиваются в клетках *Escherichia coli*. Эти несколько фагов, обо-

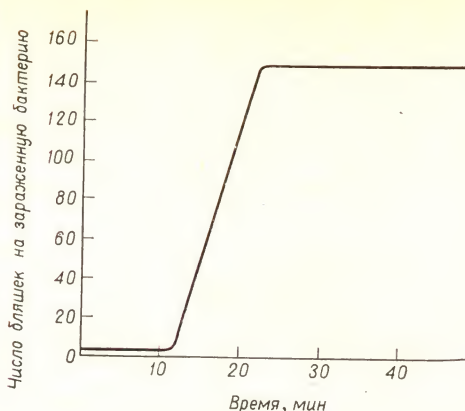


Рис. 12.9. Кривая однократного цикла развития бактериофага. Резкое возрастание количества образуемых бляшек указывает на то, что клетки хозяина лизируются и из них выходит свободный фаг.

значенные номерами от T1 до T7 (здесь T означает «тип»), были выбраны совершенно случайно группой исследователей, которые в 1939 г. начали экспериментальное изучение воспроизведения фагов. Как оказалось, три из этих фагов (T2, T4 и T6) являются близкородственными и обладают рядом свойств, которые делают их особенно удобными для экспериментальной работы. В частности, ДНК этих T-четных фагов содержит вместо цитозина уникальное основание, 5-оксиметилцитозин. Определяя химическим методом содержание оксиметилцитозина, можно следить за синтезом вирусной ДНК в зараженных клетках в присутствии избытка бактериальной ДНК.

Долгие годы считали, что T-четные фаги являются типичными представителями фагов. Однако при электронномикроскопическом исследовании выяснилось, что вирионы T-четных фагов устроены гораздо сложнее, чем у других фагов, а механизмы их адсорбции и проникновения в клетку-хозяина в значительной степени специализированы. Тем не менее после проникновения T-четных фагов в клетку в ней, по-видимому, происходят такие же события, что и при заражении другими ДНК-содержащими фагами.

АДСОРБЦИЯ И ПРОНИКНОВЕНИЕ В КЛЕТКУ

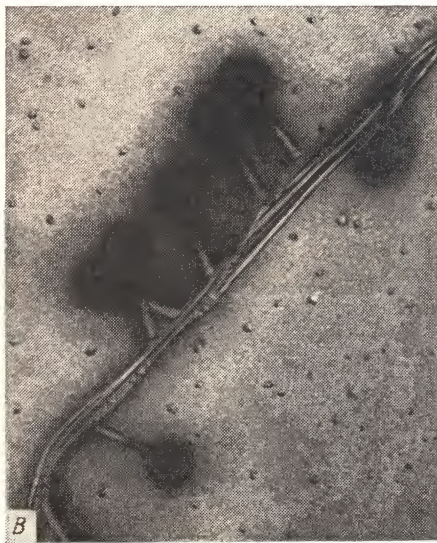
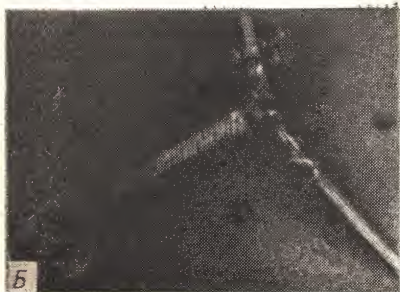
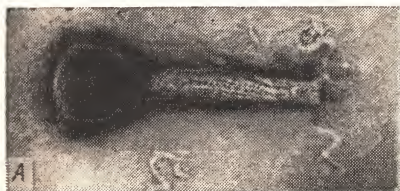
Литический цикл инфекции начинается с того, что частица бактериофага случайно сталкивается с клеткой-хозяином. Если у вириона имеется участок адсорбции, химически комплементарный специфическому *рецепторному участку* на поверхности бактериальной клетки, то происходит необратимая *адсорбция*. Рецепторы для одних фагов граммотрицательных бактерий находятся в липопротеидном наружном слое клеточной стенки, для других — в липополисахаридном слое.

169 Для ряда фагов рецепторы находятся на отростках клеток —

Рис. 12.10. Электронные микрофотографии одного из фагов *Bacillus subtilis*, который адсорбируется на жгутиках бактерии. А. Свободная частица фага ($\times 120\,000$). Видны спиральные нити

хвостового отростка. Б. Частица фага, адсорбированная на жгутике бактерии, вокруг которого обернулись нити хвостового отростка фага ($\times 120\,000$). В. Группа фаговых частиц, при-

крепившихся к нескольким жгутикам ($\times 61\,000$). [Raimondo L. M., Lundh N. P., Martinez R. J., Primary adsorption site of phage PBS1: the flagellum of *Bacillus subtilis*, J. Virol., 2, 256 (1968).]



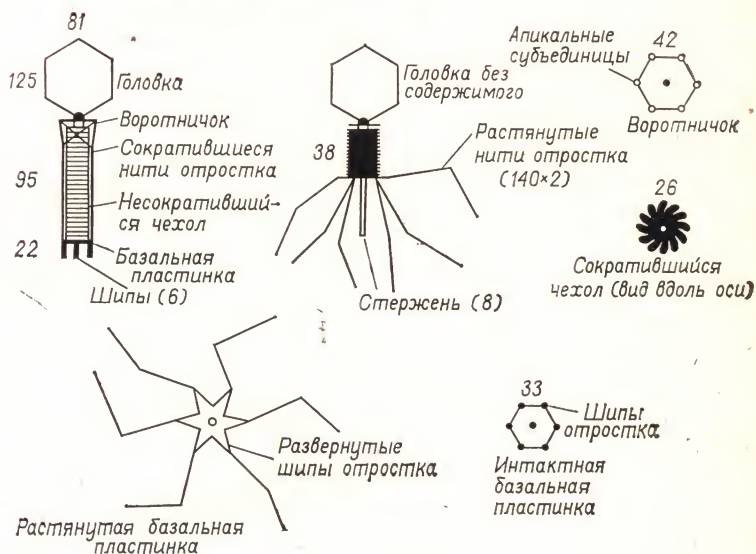
жгутиках или пиях. На рис. 12.10 показан фаг, прикрепившийся к жгутику бактерии. Такие присоединившиеся фаги соскальзывают затем к основанию жгутиков и инъецируют там свою нуклеиновую кислоту через клеточную стенку.

Адсорбционные участки вирионов у разных фагов также различаются. Некоторые фаги обладают специальными «хвостовыми нитями», являющимися органами адсорбции (рис. 12.11). В общем случае у фагов, обладающих «хвостовыми отростками», органами адсорбции служат именно эти отростки.

После адсорбции частица бактериофага инъецирует содержащуюся в ней ДНК внутрь бактериальной клетки. Этот процесс исследован на Т-четных фагах, которые имеют способный сокращаться чехол хвостового отростка. После того как нити отростка адсорбировались, чехол сокращается и стержень отростка проходит через клеточную стенку (рис. 12.12). Когда кончик стержня достигает мембраны клетки, содержащаяся в головке фага ДНК впрыскивается под стенку. Этот механизм Т-четных фагов, действующий



Рис. 12.11. А. Частица одного из Т-четных фагов, контрастированная фосфовольфрамовой кислотой. Видны заполненная головка, сократившийся чехол, стержень и нити хвостового отростка. [Brenner S. et al., Structural components of bacteriophage, J. Mol. Biol., 1, 281 (1959).] Б. Компоненты Т-четного фага. Размеры указаны в нм. [Bradley D. E., The ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins, Bacteriol. Revs., 31, 230 (1967).]



преодолевают клеточную стенку другие фаги и как фаговая ДНК проникает через мембрану клетки — остается неизвестным.

Такой процесс проникновения, когда белки капсида остаются снаружи клеточной стенки, как это имеет место в случае Т-четных фагов, считался характерным для всех бактериофагов. Однако у некоторых фагов механизм проникнове-

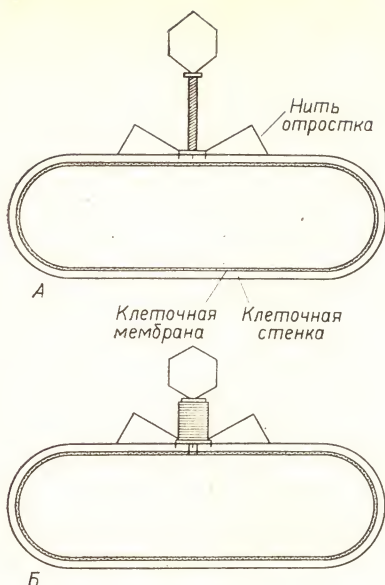


Рис. 12.12. Т-четные фаги прокалывают клеточную стенку подобно шприцу. А. Фаговая частица, адсорбированная на стенке бактериальной клетки. Чехол находится в растянутом состоянии. Б. Чехол сократился, и стержень прошел сквозь клеточную стенку.

ния совершенно иной. Так, у нитевидных (спиральных) фагов, содержащих одноцепочечную ДНК, основной белок спирального капсида проходит через клеточную стенку и остается на (или в) клеточной мембране, а минорный белок оболочки, А-белок, проникает вместе с фаговой ДНК в цитоплазму.

ОБРАЗОВАНИЕ «РАННИХ» БЕЛКОВ

Сразу же после того, как фаговая ДНК попадает в цитоплазму клетки-хозяина, РНК-полимераза клетки начинает транскрибировать некоторые ее гены и образуются «ранние» вирусные информационные РНК. Затем рибосомы клетки транслируют эти вирусные мРНК, образуя целый ряд новых ферментов, включая и все те ферменты, которые необходимы для репликации фаговой ДНК. В случае Т-четных фагов при трансляции вирусных мРНК образуются целых 11 новых ферментов, и среди них — те, которые необходимы для образования 5-оксиметилцитозина и его фосфорилирования, а также новая ДНК-полимераза и разрушающая хозяйскую ДНК дезоксирибонуклеаза¹.

Представляется вероятным, что все вирусы несут генетическую информацию для образования по крайней мере части ферментов, необходимых для репликации вирусной нуклеиновой кислоты. Однако многие вирусы в отличие от

¹ В действительности Т-четные фаги индуцируют в клетке несколько десятков «ранних» белков, большинство которых имеет отношение к метаболизму ДНК. — *Прим. перев.*

Т-четных фагов обеспечиваются некоторыми из этих важных для них ферментов за счет генома клетки-хозяина. При заражении такими вирусами хозяйская ДНК не разрушается, а продолжает функционировать и направлять синтез белков.

РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВОЙ ДНК

Репликация ДНК фагов протекает в соответствии с общим механизмом репликации, описанным в гл. 7. Однако детали этого механизма варьируют в зависимости от того, реплицируется ли фаговая ДНК в виде кольцевой или в виде линейной молекулы. Репликация кольцевой молекулы ДНК может происходить двумя разными способами. При *симметричном* способе репликации обе нити родительской молекулы ДНК играют одинаковую роль. Такого типа репликация описана в гл. 7. При *асимметричном* же способе одна из нитей родительской молекулы остается целой, замкнутой в кольцо, тогда как другая нить становится линейной. Этот тип репликации известен под названием модели «катящегося кольца». На рис. 15.10 показано, как таким способом реплицируется кольцевой половой фактор *Escherichia coli*. Подобный механизм используется некоторыми фагами для образования линейных молекул ДНК из кольцевых репликативных промежуточных форм.

В случае фагов, содержащих одноцепочечную ДНК, проникшая в клетку молекула с помощью бактериальной ДНК-полимеразы быстро превращается в двухцепочечную, после чего репликация происходит по обычному полуконсервативному механизму. Однако вскоре такая обычная репликация прекращается, и вместо этого начинается новый ферментативный процесс, при котором на двухцепочечной матрице образуются цепи только одного типа. В конце концов эти новые отдельные цепи молекулы ДНК включаются в частицы фагового потомства.

В процессе репликации в молекулах фаговой ДНК случайно могут произойти замены отдельных пар оснований (*мутации*), а также разрывы и воссоединения цепей. Если бактериальная клетка заражается одновременно двумя генетически различающимися, но родственными фагами, то в результате таких разрывов и воссоединений образуются рекомбинантные молекулы фаговой ДНК. Возникновение мутаций и рекомбинация у фагов более подробно описаны в гл. 13, 14 и 15.

СОЗРЕВАНИЕ ФАГОВЫХ ЧАСТИЦ

Вскоре после начала репликации фаговой ДНК начинается синтез «поздних» вирусных информационных РНК на тех участках ДНК-матрицы, которые до этого не транскрибировались. В результате трансляции этих поздних информационных РНК образуется второй набор вирус-специфических

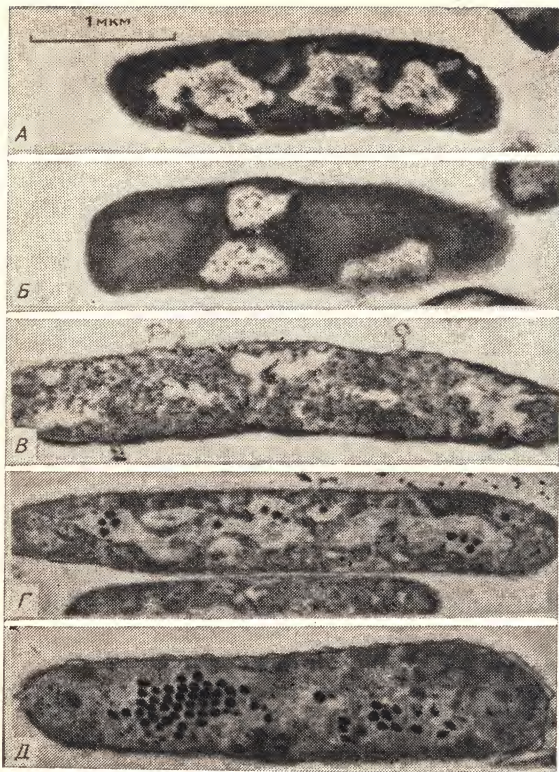


Рис. 12.13. Электронные микрофотографии тонких срезов клеток *E. coli* ($\times 25\,700$), показывающие последовательные этапы развития фага в этой бактерии. А. Незараженная клетка. Б. Клетка через 4 мин после заражения. Видно изменение структуры ДНК-содержащей области (светлая часть клетки). В. 10-я минута после заражения. Г. 12-я минута после заражения. В тех областях клетки, которые содержат ДНК, начинают появляться первые новые фаговые тельца или конденсаты ДНК (темные пятна). Д. 30-я минута после заражения (незадолго до лизиса). Внутри зараженной клетки видно много фаговых частиц. (С любезного разрешения Е. Келленбергера, Е. Бой-де-ла-Тура, Ж. Сешо и А. Рейтера.)

белков, в том числе и субъединицы вирусного капсида. Одновременно с накоплением субъединиц капсида происходит конденсация молекул вирусной ДНК. В результате взаимодействия со специфическим вирусным белком, так называемым «конденсирующим веществом», каждая молекула ДНК плотно упаковывается в виде многогранника (рис. 12.13). Затем с этими конденсатами связываются субъединицы капсида, и образуются уже зрелые головки фага. В случае Т-четных фагов за счет полимеризации других фаговых субъединиц образуется хвостовой отросток, и созревание завершается сборкой отростков и головок в полные вирионы.

Этот процесс *самосборки* управляется неизвестными пока продуктами определенных генов вируса. Под действием продуктов этих «морфопоэтических» генов, например, особые капсомеры помещаются в определенные места частицы, и в результате образуются вершины полиэдрической головки фага. Если фаги несут мутации по генам морфопоэза¹, то про-

¹ Такие мутации летальны, поэтому их можно изучать только в случае «условно-летальных» мутаций, которые в одних хозяевах проявляются, а в других — нет (см. гл. 14).

Рис. 12.14. Полиголовки фага T4. А. Полиголовки внутри частично лизированной клетки. Видна адсорбированная на поверхности клетки частица фага. Б. Полиголовки, фиксированные

формальдегидом и контрастированные фосфовольфрамовой кислотой. Для сравнения в препарат добавлена интактная частица фага. [Favre R., Boy de la Tour E., Segré N., Kellenberger E.,

Studies on the morphogenesis of the head of phage T-even. I. Morphological, immunological and genetic characterization of polyheads, J. Ultrastructure Res., 13, 318 (1965).]



исходит неправильная полимеризация капсомеров и образуются причудливые структуры, например «полиголовки» или «поличехлы» (рис. 12.14).

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ЗРЕЛЫХ ВИРИОНОВ

При литической инфекции в конце латентного периода в клетке появляется еще один «поздний» вирус-специфический белок — фаговый лизоцим. Это фермент воздействует на пептидогликановый слой стенки бактериальной клетки, гидролизует связи между остатками сахара в цепях остова слоя. В результате стенка постепенно становится все менее прочной и в конце концов разрывается под действием внутриклеточного осмотического давления, а фаговое потомство выходит вместе с остальным содержимым клетки в окружающую среду.

Хотя обычно фаги высвобождаются из клетки-хозяина в результате ее лизиса, из этого общего правила имеется исключение, которое составляют нитевидные ДНК-содержащие фаги, например фаг fd. В этом случае новосинтезированные белки фаговой оболочки располагаются на клеточной мембране. Созревание фага и его высвобождение происходят

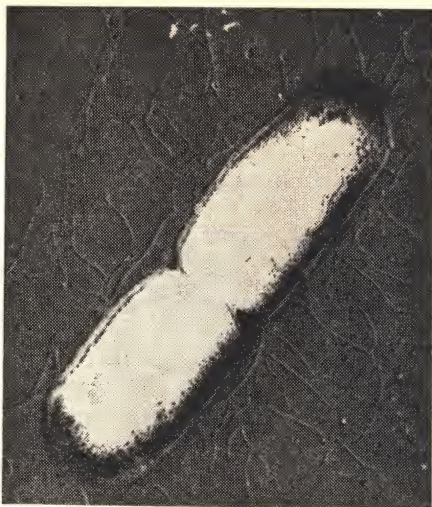


Рис. 12.15. Живая бактериальная клетка, из которой высвобождаются частицы нитевидного фага. Микрофотография сделана через 30 мин после заражения и после того, как клетки были отмыты от неадсорбированных частиц фага. [Hofschneider P. H., Preuss A., M13 bacteriophage liberation from intact bacteria as revealed by electron microscopy, J. Mol. Biol., 7, 450 (1963).]

ки и во время прохождения через мембрану соединяется с белком оболочки. Во время этого процесса высвобождения фаговых частиц клетка-хозяин остается жизнеспособной и продолжает расти (рис. 12.15).

ЛИЗОГЕНИЯ

При описанном выше литическом цикле инфекции каждая зараженная клетка в конце концов лизируется, высвобождая частицы вирусного потомства. Однако у многих бактериофагов взаимоотношения с хозяином могут складываться иначе. После проникновения в клетку геном такого вируса может репродуцироваться синхронно с геномом хозяина; бактерия при этом выживает и нормально делится, образуя клон зараженных клеток. В большинстве клеток потомства структурных вирусных белков не образуется, и большая часть генов вируса оказываются *репрессированными*. Однако изредка в отдельных клетках геном вируса спонтанно дерепрессируется, начинается литический цикл развития, клетки в конце концов лизируются и высвобождают зрелые вирионы.

Такое взаимоотношение вируса с хозяином называется *лизогенией*, а зараженные клетки, обладающие латентной способностью образовывать зрелые фаговые частицы, называются *лизогенными*. Бактериофаги, способные к таким взаимоотношениям с хозяином, называются *умеренными*, а присутствующий в клетках лизогенной культуры геном вируса называется *профагом*.

Итак, когда чувствительный хозяин заражается частицей умеренного фага, то у проникшего в клетку генома фага появляются две возможности. Он может либо начать быстро

вегетативно размножаться, что завершается образованием зрелых вирионов и лизисом клетки-хозяина, либо перейти в состояние профага и дать начало клону лизогенных клеток. Когда к культуре чувствительной линии клеток-хозяев добавляется суспензия фаговых частиц и заражаются все бактерии, некоторые клетки встают на путь «продуктивной» инфекции и лизируются, а остальные становятся лизогенными. Доля клеток, развивающихся по тому или иному пути, зависит от генетической конституции хозяина, генома вируса и от окружающих условий. Варьируя в опыте каждую из этих переменных, можно выяснить, какие факторы влияют на судьбу отдельной клетки.

Такого типа опыты выявили следующую картину. В каждой только что зараженной клетке более или менее одновременно протекают три процесса: 1) транскрипция генома вируса и трансляция с образованием «ранних» белков, в том числе и *репрессора* или нескольких различных типов репрессоров, подавляющих и репликацию вируса, и выражение вирусных генов; 2) репликация генома вируса и 3) переход одного из реплицированных геномов (или сразу нескольких) в состояние профага. Поэтому судьба клетки, в которой индуцируются все эти три процесса, зависит от исхода «соствязания» между образованием репрессора и созреванием вируса. Если зрелые вирионы и лизосим успевают образоваться до того, как проявится действие репрессора, то клетка лизируется. Если же молекулы репрессора накапливаются достаточно быстро и успевают выключить репликацию вируса и выражение его генов до того, как образуются зрелые вирионы и фаговый лизосим, то клетка станет лизогенной. В лизогенной клетке профаг продолжает образовывать молекулы фагового репрессора, которые препятствуют как вегетативной репликации, так и созреванию фага.

Молекулы репрессора не препятствуют той репликации профага, которая происходит синхронно с клеткой. Следовательно, *репликация профага* и *вегетативная репликация* вируса представляют собой разные процессы; они будут рассмотрены в следующих разделах.

ЛИЗОГЕНИЯ λ -ТИПА

Большинство исследований по выяснению природы профага и лизогенного состояния проведено с ДНК-содержащим бактериофагом λ , который сначала был обнаружен в виде профага, присутствующего в штамме K12 *E. coli*¹. Когда культуру штамма K12 выращивают в лабораторных условиях, примерно одна из 10^4 клеток культуры лизируется и высвобож-

¹ Штамм K12 относится к коллекции штаммов *E. coli*, выделенных от больных в госпитале Стенфордского университета. Случайно он был выбран для первых исследований по генетике бактерий и в результате стал стандартным штаммом в генетических исследованиях.

дает зрелые частицы фага λ . Еще реже при делении возникает дочерняя клетка, не получающая копии профага. Как говорят, такая клетка «излечивается» от профага. Выделив «излечившуюся» нелизогенную клетку и размножив ее, мы получим клетки, свободные от фага λ , которые можно снова заразить и лизогенизировать. Если для этого использовать мутант фага λ , то каждая лизогенная клетка наследует способность образовывать частицы фага λ мутантного типа.

Эти данные показывают, что профаг λ состоит из одной или нескольких копий генома фага. Где локализован этот геном фага λ в лизогенной клетке? Каков механизм, обеспечивающий синхронную репликацию этого генома и почти обязательную сегрегацию его реплик в дочерние клетки?

Чтобы ответить на эти вопросы, необходимо было провести эксперименты по генетической рекомбинации лизогенных бактерий с нелизогенными («излечившимися») бактериями или с лизогенными клетками, которые несут профаги, полученные из разных мутантов фага λ . Как будет показано в гл. 15, штамм K12 *E. coli* способен к рекомбинации посредством конъюгации, трансдукции или трансформации. При всех этих трех процессах участки бактериальной хромосомы от одной клетки (генетического донора) переносятся к другой клетке (генетическому реципиенту). В результате этого реципиент становится частичным диплоидом, *мерозиготой*. Рекомбинация приводит к образованию в мерозиготе рекомбинантных хромосом, которые в конце концов сегрегируют, и получают рекомбинантные дочерние клетки.

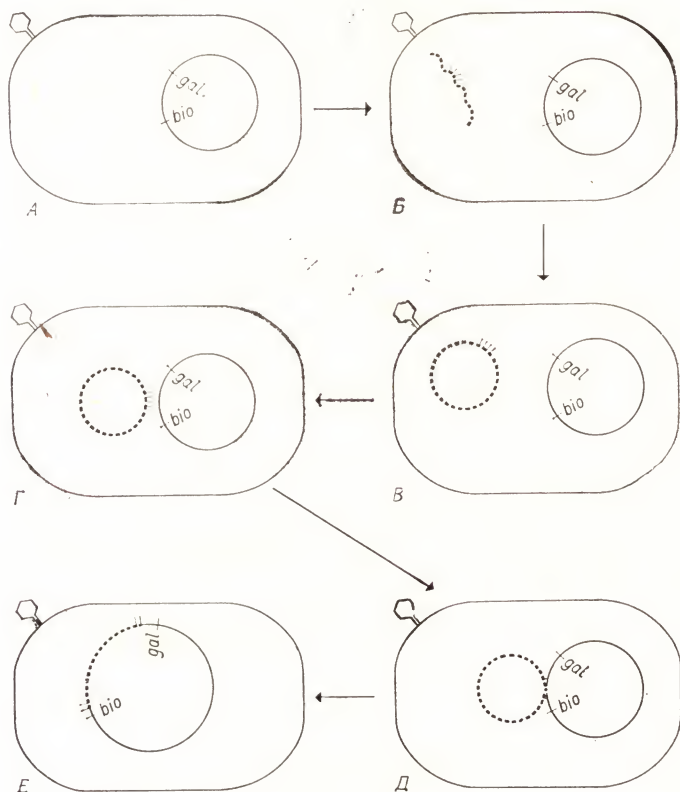
Как мы увидим в гл. 15, опыты по рекомбинации позволяют проводить *картирование* бактериальной хромосомы. Если донор и реципиент отличаются по нескольким генетическим признакам, то, проводя анализ рекомбинантов, можно определить, какие гены были унаследованы ими от родителя-донора, а какие — от реципиента. Чем ближе друг к другу расположены два гена на хромосоме донора, тем с более высокой частотой они будут совместно наследоваться одной и той же рекомбинантной клеткой. Такие гены называют *тесно сцепленными*. При рекомбинации нелизогенных донорных клеток с несущими профаг λ реципиентными клетками профаг λ наследуется таким образом, как будто бы он *занимает определенное место на хромосоме бактерии* между генами *gal* и *bio*, которые кодируют ферменты, участвующие соответственно в метаболизме галактозы и в биосинтезе биотина. Следовательно, профаг λ прикреплен к бактериальной хромосоме и реплицируется синхронно с ней. При клеточном делении каждая дочерняя клетка получает бактериальную хромосому вместе с прикрепленным к ней профагом λ .

Почти 10 лет природа этого прикрепления профага к хромосоме оставалась таинственной. В 1962 г. А. Кемпбелл (A. Campbell) высказал предположение, что профаг соеди-

Рис. 12.16. Образование профага λ . А. Адсорбция вирусной частицы. Б. Инъекция вирусной ДНК внутрь клетки. В. Замыкание генома вируса в кольцо. Г. Спаривание гомологичных участков геномов вируса и бакте-

рии. Д. Перекрест внутри спаренного участка. Е. Геномы фага и бактерии объединяются, образуя единое кольцо. Заметьте, что участок прикрепления для профага λ занимает в геноме бактерии определен-

ное положение между локусами *gal* и *bio* (см. рис. 15.14). Четырьмя короткими вертикальными черточками в ДНК фага λ показан специфический участок прикрепления этой ДНК к хромосоме бактерии.

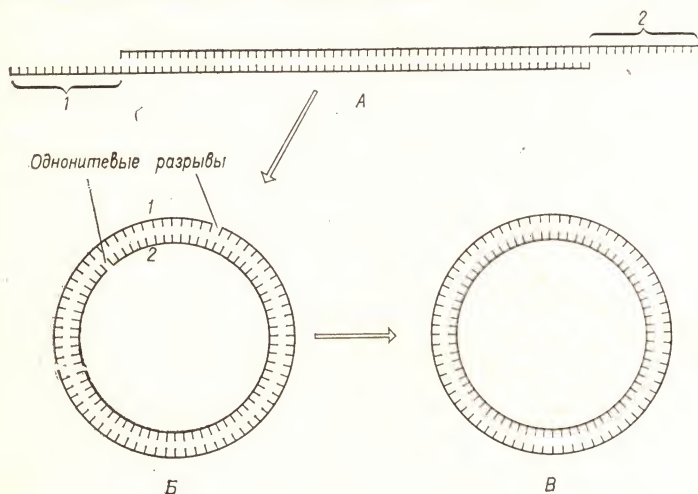


няется с хромосомой в результате процесса, схематически представленного на рис. 12.16. В соответствии с «моделью Кемпбелла» сразу после того, как геном фага λ проникает в клетку-хозяина, он замыкается в кольцо. Геном фага λ имеет участок, который спаривается со специфическим участком бактериальной хромосомы, расположенным рядом с локусом *gal*. В результате *единичного перекреста внутри области спаривания* геном фага λ оказывается *встроенным в бактериальную хромосому*. Встроенный в хромосому геном и представляет собой профаг λ . Начиная с этого момента он реплицируется уже как часть бактериальной хромосомы да-

Рис. 12.17. Превращение линейной формы генома фага λ в кольцевую. А. На каждом из концов линейного генома фага λ имеются взаимно комп-

лементарные одноцепочечные участки. Б. Эти участки соединяются с образованием водородных связей между комплементарными основа-

ниями. В. Полинуклеотидлигаза «сшивает» цепь, и получается ковалентно замкнутое кольцо.



же в том случае, если репликация свободной ДНК фага полностью подавляется фаговым репрессором.

Модель Кемпбелла подтверждена множеством различных экспериментов. Показано, что содержащийся в зрелом вирионе геном фага λ имеет одноцепочечные «липкие» концы с комплементарными последовательностями (рис. 12.17). Образование водородных связей между этими участками приводит к тому, что ДНК фага λ замыкается в кольцо. Затем такое кольцо сшивается ковалентно с помощью полинуклеотидлигазы.

Перекрест, в результате которого ДНК фага λ встраивается в хромосому бактерии, осуществляется целым набором рекомбинационных ферментов. Они разрезают молекулы ДНК, а затем соединяют разорванные концы уже в новых сочетаниях (см. гл. 15). Те же самые ферменты, когда они действуют на структуру с уже интегрированным профагом, могут привести к его исключению. Как показано, именно такое исключение является первым этапом процесса, изредка приводящего к случайному образованию лизогенной клеткой зрелого вируса. Эти данные приводят к кажущемуся парадоксу: если штамм K12 *E. coli* обладает полным набором рекомбинационных ферментов, то что же препятствует исключению профага λ в подавляющем большинстве клеток лизогенной культуры? Этот парадокс был разрешен, когда выяснилось, что для интеграции генома фага λ с хромосомой бактерии необходимы специфические ферменты рекомбина-

ции, которые кодируются генами этого фага. Интеграция происходит до того, как успел появиться репрессор фага λ ; однако если репрессор в клетке появился, он подавляет активность всех генов фага λ , в том числе и тех, которые определяют синтез ферментов рекомбинации. В результате исключение профага λ всегда предотвращается; оно имеет место лишь в тех редких клетках, в которых репрессор оказался инактивированным. Инактивацию репрессора, которая приводит к исключению профага и переключению его на литический путь развития, мы рассмотрим ниже.

Как оказалось, описанные выше события происходят и при образовании профага рядом других фагов, родственных фагу λ (например, фагом Ø80, профаг которого встраивается в хромосому рядом с локусом *trp*, кодирующим ферменты биосинтеза триптофана).

ЛИЗОГЕНИЯ P1-ТИПА

Многие бактериофаги, из которых лучше всего изучен фаг P1, отличаются от фагов группы λ двумя очень важными свойствами. Во-первых, опыты по рекомбинации между лизогенными и нелизогенными клетками не выявили определенного места локализации профага P1 и других фагов этого типа на хромосоме бактерии. Иногда можно наблюдать перенос профага P1 при конъюгации, но при этом не обнаруживается сцепления профага с определенными генами бактерии. Во-вторых, фаги P1 и λ различаются по способу образования трансдуцирующих частиц, т. е. таких вирионов, которые содержат фрагменты хозяйской ДНК. Как будет показано в гл. 15, трансдуцирующие частицы фагов типа λ содержат большой сегмент генома фага, ковалентно соединенный с сегментом хромосомы хозяина, находившимся рядом с местом интеграции профага. Как видно из рис. 15.20, трансдуцирующая частица получается в результате того, что обычный процесс исключения профага происходит с небольшой ошибкой. Напротив, трансдуцирующие частицы типа P1 содержат в основном хозяйскую (бактериальную) ДНК. Новосинтезированная фаговая ДНК составляет менее 10% ДНК трансдуцирующих частиц. Кроме того, фаги типа P1 способны осуществлять трансдукцию любого сегмента бактериальной хромосомы, тогда как фаг λ может переносить при трансдукции лишь те гены бактерии, которые расположены на хромосоме непосредственно рядом с сайтом его интеграции.

Таким образом, ни опыты по генетическому картированию, ни анализ трансдуцирующих частиц не смогли выявить локализации профагов типа P1 на хромосоме бактерии. ДНК фага P1, выделенная из лизогенных клеток, оказывается кольцевой молекулой того же размера, что и молекулы ДНК в вирионах P1; ее связи с бактериальной ДНК не обнаружи-

вается. Это подтверждает внехромосомную локализацию профага P1.

Весьма вероятно, что профаги типа P1 прикреплены не к хромосоме, а к мембране клетки. Наличие на мембране таких мест прикрепления объясняет, по-видимому, упорядоченную репликацию и сегрегацию внехромосомных генетических элементов — плазмид (что также будет рассмотрено в гл. 15). Например, на мембране клеток штамма *E. coli* K12 имеются места прикрепления не только для хромосомы бактерии, но и для фактора F, плазмиды, которая служит «половым фактором» у *E. coli*. Как будет рассмотрено в гл. 15, механизмы репликации и сегрегации как хромосомы, так и фактора F связаны с прикреплением этих генетических элементов к мембране клетки.

Таким образом, фаг типа P1 может реплицироваться синхронно с клеткой в виде профага, который, по-видимому, прикреплен к клеточной мембране, или может пойти по литическому пути и начать неконтролируемую вегетативную репликацию. В большинстве лизогенных клеток литическое развитие предотвращается в результате действия фагового репрессора, точно так же, как это происходит в случае лизогении фагами типа λ . Интересно, что можно выделить такие мутанты *E. coli*, в которых профаг λ не способен интегрироваться с ДНК хозяина и в которых устанавливается лизогения типа P1, т. е. профаг λ становится автономно реплицирующимся элементом.

РЕПРЕССИЯ И ИНДУКЦИЯ

Механизм фаговой репрессии, который блокирует литическое развитие и тем самым позволяет поддерживать лизогенное состояние клетки, лучше всего изучен на примере штамма *E. coli* K12(λ). Выяснилось, что в геноме фага λ имеется специальный ген (ген C_1), кодирующий белок-репрессор. В геноме фага λ есть также и рецепторный участок, с которым этот репрессор может специфически связываться. Если рецептор не занят репрессором, то идет репликация ДНК, транскрипция генов и образование вирус-специфических белков. Если же молекула репрессора связалась с геномом фага, то подавляются и репликация, и выражение генов. Исключение составляет лишь сам ген C_1 — синтез белка-репрессора продолжается и после выключения всех других функций фага λ .

Часто возникают вирулентные мутанты умеренного фага. Такие мутанты не способны лизогенизировать клетку-хозяина, хотя и сохраняют способность к литическому циклу инфекции. Их легко выявить, так как они образуют прозрачные бляшки на газоне чувствительных бактерий; не несущие таких мутаций частицы умеренного фага, наоборот, образуют мутные бляшки, поскольку многие клетки в области бляшки

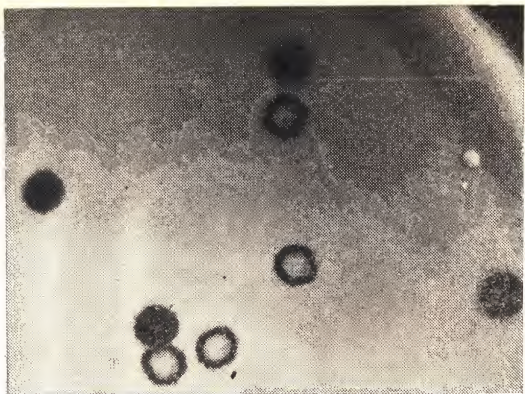


Рис. 12.18. Бляшки, образованные бактериофагом λ дикого типа и его вирулентным мутантом. Частицы дикого типа образуют мутные бляшки, так как происходит вторичный рост лизогенизированных клеток. Мутантные частицы, которые не способны лизогенизировать бактерию-хозяина, образуют прозрачные бляшки с резко очерченными краями. (С любезного разрешения К. Реддинга.)

становятся лизогенными и образуют микроколонии (рис. 12.18). При выделении вирулентных мутантов фагов обнаружилось, что они бывают двух разных типов. Встречаются фаги, у которых ген C_1 мутировал таким образом, что репрессор более уже не образуется, а бывают фаги, у которых изменен рецептор и репрессор с ним не может связываться.

Некоторые фаги, в том числе и фаг λ , являются *индуцибельными*: если хозяйскую клетку подвергнуть какому-либо из многочисленных воздействий, вызывающих повреждения в ДНК, — ультрафиолетовому облучению, временному голоданию по тимину, обработке митомичином С или алкилирующими агентами, — то их профаги вступают на литический путь развития. Возможно, вызванные этими воздействиями повреждения в ДНК неспецифически связывают репрессор фага λ , и его просто не хватает на то, чтобы заблокировать рецепторный участок фага¹.

Массовую индукцию культуры, лизогенной по фагу λ , можно осуществить двумя способами. В основе одного из них лежит конъюгация (см. гл. 15), в ходе которой лизогенные клетки-доноры переносят свои хромосомы (включая и интегрированный профаг λ) в нелизогенные реципиенты. Поскольку при конъюгации цитоплазма донорной клетки реципиенту не передается (или передается в очень небольшом количестве), а в цитоплазме реципиента репрессор отсутствует, то происходит немедленная индукция перенесенного в реципиентную клетку профага. Этот процесс называется *зиготной индукцией*. Можно также использовать для индукции такой мутант фага λ по гену C_1 , который образует термо-

¹ В последнее время появились данные, что повреждения в ДНК индуцируют специфическую систему репарации бактерии. С этой системой, по-видимому, связана АТФ-зависимая протеаза, которая специфически расщепляет репрессор фага λ . [Roberts J. W., Roberts C. W., Maunt D. W., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 74, 2283 (1977).] — Прим. перев.

лабильный репрессор. Мутантный репрессор нормально функционирует при 37°C, но денатурирует при 43°, тогда как репрессор дикого типа стабилен при обеих температурах. Культуру, лизогенизированную таким мутантом фага λ , можно выращивать при 37°C, а при переносе ее на 43° происходит массовая индукция.

Как указывалось ранее, в растущей культуре штамма K12 спонтанно лизируется и высвобождает вирионы фага λ лишь одна из $\sim 10^4$ клеток на поколение. Это показывает, насколько мала вероятность того, что в популяции клеток в какой-то из них не образуется или не подействует репрессор.

ИММУННОСТЬ

Если клетки лизогенной культуры адсорбируют частицы другого фага, то они оказываются *суперинфицированными*. ДНК второго фага проникает в лизогенную клетку, но ее способность к репродукции зависит от того, чувствительна ли она к тому репрессору, который образуется профагом, уже находящимся в клетке. Если суперинфицирующий фаг нечувствителен к этому репрессору, то он размножится и клетка лизируется, если же чувствителен, то суперинфекция будет *абортивной*, т. е. ДНК суперинфицирующего фага не будет реплицироваться, а в течение последующих клеточных делений произойдет постепенное ее «разбавление». В этом случае говорят, что лизогенные клетки *иммунны* к суперинфицирующему фагу.

Если два фага проявляют чувствительность к одному и тому же репрессору, то они обладают одинаковой иммунностью и называются *коиммунными*. Например, если клетка содержит в виде профага один из штаммов λ , то она будет иммунна к суперинфекции любым другим штаммом фага λ . Исключение, конечно, составляют вирулентные мутанты, которые потому и вирулентны, что нечувствительны к своему собственному репрессору. Такой вирулентный мутант будет успешно суперинфицировать любую лизогенную по λ клетку.

Легко показать, что иммунность к суперинфицирующему фагу обусловлена тем же самым репрессором, который отвечает за поддержание лизогенного состояния. Например, облучение культуры, лизогенной по какому-нибудь индуцибельному фагу, приводит одновременно к индукции профага и делает клетки неиммунными. Если сразу после облучения провести суперинфекцию такой культуры, то все клетки лизируются, а получившееся фаговое потомство будет вести свое происхождение и от профага, и от суперинфицировавшего фага.

Иммунность необходимо отличать от той *устойчивости* к фагу, которая контролируется генетически. Устойчивость к фагу возникает в результате мутаций в хромосоме бакте-

рии, приводящих к тому, что на поверхности клетки не оказывается рецепторов для фага. В отличие от иммунной клетки такая клетка, у которой устойчивость к фагу обусловлена генетически, не способна адсорбировать фаговые частицы.

ДЕФЕКТНЫЕ ПРОФАГИ

Время от времени в профагах происходят мутации или делеции, которые делают профаг не способным к нормальному развитию. Мутация может, например, привести к тому, что утрачивается способность к вегетативной репликации или способность синтезировать какой-нибудь существенный для развития вирусный белок. Такие профаги называются *дефектными*. Их присутствие в клетке выявляется по тому, что клетка сохраняет свою иммунность к суперинфекции коиммунным фагом. Кроме того, если дефектный профаг получился из индуцибельного фага, то обработка таких клеток индуцирующими агентами может по-прежнему дерепрессировать оставшиеся функциональными гены профага и привести к лизису клетки под действием фагового лизоцима.

Поэтому, обрабатывая клетки индуцирующими агентами, можно выявить наличие дефектных профагов в бактериях, выделенных из природных источников. Лизис клеток укажет на то, что они содержат какой-то индуцибельный дефектный профаг. Это можно проверить, исследовав лизат под электронным микроскопом для выявления в нем неполных капсид. В некоторых случаях можно показать присутствие в клетках дефектного профага, проводя суперинфекцию родственным фагом. Тогда в полученном лизате обнаруживаются *рекомбинантные* фаги, которые унаследовали одни гены от дефектного профага, а другие — от суперинфицирующего фага. Такой лизат может также содержать *смесь* нормального и дефектного фагов, причем в этом случае репродукция дефектного фага оказывается возможной потому, что нарушенная у него функция восполняется суперинфицирующим фагом.

РНК-СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИОФАГИ

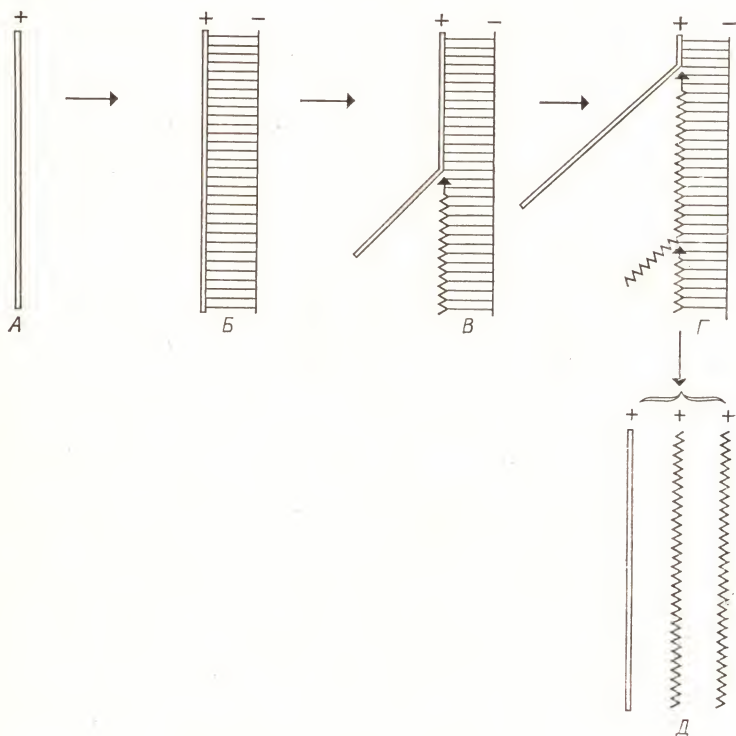
У многих бактериофагов генетическим материалом в вирионах является одноцепочечная молекула РНК.

Сразу же после того, как молекула вирусной РНК проникает в цитоплазму клетки-хозяина, она опознается рибосомами как информационная. Рибосомы связываются с ней и синтезируют на этой РНК вирусные белки. Один из них представляет собой сложный белок, *РНК-репликазу* (РНК-зависимую РНК-полимеразу). Этот фермент осуществляет репликацию вирусной РНК, полимеризуя рибонуклеозидтрифосфаты и используя в качестве матрицы вирусную РНК.

Рис. 12.19. Репликация РНК-содержащего вируса. А. Проникающая в клетку родительская цепь обозначена знаком «+». Б. РНК-репликаза вируса образует двухцепочечную промежуточ-

ную форму. В, Г. Другая репликаза использует эту форму в качестве матрицы и синтезирует на ней ряд «+»-цепей потомства. Д. Вытесняемые из комплекса родительская цепь и

цепи потомства либо включаются в вирионы, либо используются репликазой для образования новых двухцепочечных промежуточных форм.



В процессе репликации РНК сначала образуется *двухцепочечная промежуточная форма*. При этом попавшая в клетку цепь вирусной РНК (называемая «плюс»-цепью) используется репликазой в качестве матрицы для образования комплементарной ей «минус»-цепи (рис. 12.19). Затем репликаза использует в качестве матрицы уже эту двухцепочечную молекулу и синтезирует последовательно все новые и новые «плюс»-цепи, причем каждая из них вытесняет предыдущую из промежуточной репликативной формы.

После того как новосинтезированные «плюс»-цепи выходят из состава репликативной промежуточной формы, они либо вновь используются репликазой для образования новой двухцепочечной промежуточной формы, либо соединяются с капсомерами, образуя зрелые вирионы.

НЕКОТОРЫЕ ВАЖНЫЕ ГРУППЫ - ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

По мере развития исследований вирусов животных выяснилось, что их можно подразделить на ряд групп, каждая из которых объединяет вирусы, обладающие многими общими свойствами. В некоторых случаях эти группы были выделены только исходя из структуры вирионов. Например, группа пикорнавирусов включает все мелкие РНК-содержащие вирусы [«пикорна» (picorna) составлено из слов «маленький» (pico) и РНК (RNA)]. В других случаях для объединения вирусов в группу основанием служила их экология. Например, группа арбовирусов включает все вирусы, которые переносятся членистоногими (*arthropod-borne*). Некоторые важные группы вирусов животных описаны в табл. 12.2.

ВЫЯВЛЕНИЕ ЧАСТИЦ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ЧИСЛА

Некоторые методы определения числа частиц вирусов животных совершенно аналогичны описанному выше методу подсчета числа бляшек для бактериофагов. И в том, и в другом случае частицы вируса наносят на поверхность слоя клеток-хозяев. Каждая частица заражает отдельную клетку слоя, и эта клетка становится центром инфекции для соседних клеток.

Метод «оспин» состоит в том, что частицы вируса наносят на поверхность хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона. Суспензию частиц вводят через маленькое отверстие, которое пробивают в яичной скорлупе и затем тщательно заклеивают. Яйца инкубируют до тех пор, пока каждый вирус не образует на мембране видимого невооруженным глазом повреждения, «оспины». Затем скорлупу удаляют и подсчитывают число таких «оспин».

Метод бляшек заключается в том, что частицы вируса наносят на монослой клеток, растущих в плоском сосуде. После адсорбции вирусных частиц на клетках жидкую среду удаляют, а клетки покрывают слоем мягкого агара. Выходящие из первоначально зараженной клетки вирусные частицы могут достичь соседних клеток монослоя, но далеко диффундировать в агаре они не могут. После соответствующей инкубации каждая первично зараженная клетка приводит к образованию бляшки, или зоны зараженных клеток. Методы выявления бляшек для разных вирусов могут различаться. Некоторые вирусы вызывают цитопатический эффект, т. е. убивают хозяйские клетки. В этом случае для выявления

ТАБЛИЦА 12.2
ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ, СПОСОБНЫХ ВЫЗЫВАТЬ
БОЛЕЗНИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

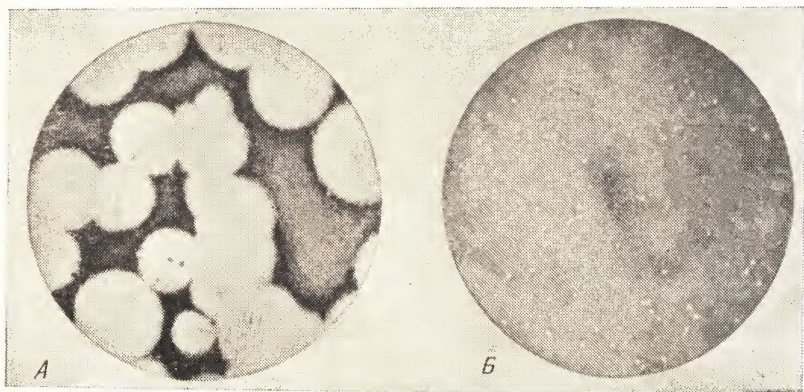
Группа	Физико-химические свойства	Другие характерные признаки	Примеры
Аденовирусы	Лишенный оболочки икосаэдрический капсид, содержащий двухцепочечную ДНК	Вездесущие агенты, вызывающие латентные инфекции лимфатической ткани; многие из них вызывают опухоли у экспериментальных животных	Представители этой группы обозначаются как «тип» с соответствующим номером
Паповавирусы	Лишенный оболочки икосаэдрический капсид, содержащий двухцепочечную ДНК	Индукцируют опухоли у животных	Вирусы полиомы, папилломы, SV40
Герпесвирусы	Имеющий оболочку сложный капсид, содержащий двухцепочечную ДНК	Имеют тенденцию вызывать латентные инфекции	Вирусы простого герпеса, ветряной оспы, псевдобешенства
Поксвирусы	Имеющий оболочку спиральный (?) капсид, содержащий двухцепочечную ДНК	Очень крупные; по форме варьируют от напоминающих кирпичики до яйцевидных; имеют склонность к эпидермальным клеткам; два представителя этой группы (вирусы миксомы и фибромы) вызывают опухоли	Вирусы натуральной оспы, осповакцины, коровьей оспы

Пикорнавирусы	Лишенный оболочки икосаэдрический капсид, содержащий одноцепочечную РНК	Небольшого размера; вызывают кишечные и/или респираторные заболевания	Вирусы полиомиелита, Коксаки, ЕСНО, риновирусы
Реовирусы	Лишенный оболочки икосаэдрический капсид, содержащий двухцепочечную РНК	Крупные; вездесущие инфекционные агенты, но явных болезней не вызывают	Представители этой группы обозначаются как «тип» с соответствующим номером
Арбовирусы	Имеющий оболочку, по-видимому икосаэдрический капсид, содержащий одноцепочечную РНК	Переносятся насекомыми (москитами, клещами)	Вирусы желтой лихорадки, энцефалита лошадей, денге, колорадской клещевой лихорадки, вирус синдбис
Миксовирусы	Имеющий оболочку спиральный капсид, содержащий одноцепочечную РНК	Размножаются в ядре; обычно образуют нитевидные вирионы	Вирус гриппа
Парамиксовирусы	Имеющий оболочку спиральный капсид, содержащий одноцепочечную РНК	Размножаются в цитоплазме; образуют гемолитический вирион	Вирусы паратифа, свинки, кори, ньюкастской болезни, собачьей чумки
Лейковидные вирусы	Имеющий оболочку капсид, строение которого точно не известно, содержит одноцепочечную РНК	Вызывают опухоли у животных	Вирусы лейкемии мышей и кошек, вирус опухоли молочной железы мышей, вирусы лейкемии птиц, вирус саркомы Рауса

Рис. 12.20. Бляшки, образуемые вирусом энцефаломиокардита на слое животных клеток. По-

казаны бляшки двух разных генетически детерминированных типов. Крупные бляшки (А)

имеют диаметр 10—12 мм, тогда как мелкие (Б) — 0,5 мм. (С любезного разрешения Г. Либхабера.)



бляшек используют красители, по-разному окрашивающие живые и мертвые клетки (рис. 12.20). Если вирусы не убивают хозяйские клетки, то бляшки можно выявить, залив слой клеток таким реагентом, который специфически взаимодействует с компонентами вируса, например, флуоресцирующими антителами.

Вирионы многих вирусов животных, как имеющие оболочку, так и лишенные ее, прочно связываются со специфическими рецепторами на поверхности эритроцитов. На каждом вирионе имеется несколько участков адсорбции, поэтому он может связаться одновременно с двумя эритроцитами и образовать мостик между ними. Таким образом, если в суспензию эритроцитов добавить достаточное количество вирионов, эритроциты агглютинируют. Это явление называется *гемагглютинацией*, и с его помощью можно быстро выявлять такие вирусы, которые адсорбируются на эритроцитах. На практике определяют гемагглютинирующую активность последовательных разведений препарата вируса, а величина, обратная наивысшему разведению, еще проявляющему гемагглютинирующую активность, составляет титр препарата. Например, если препарат вируса вызывает гемагглютинацию в разведении 1:320, но уже не вызывает гемагглютинации в разведении 1:640, то титр вируса в этом препарате равен 320.

Описанный метод гемагглютинации представляет собой частный случай общего метода, известного под названием метода конечных разведений, когда определяют то наибольшее разведение препарата, при котором еще проявляется та или иная активность вируса, например вызываемая им гибель

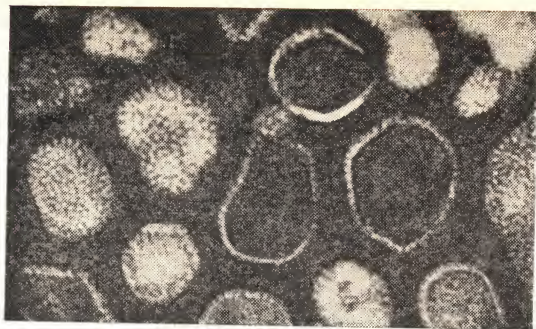


Рис. 12.21. Частицы вируса гриппа, на поверхности которых видны «выступы», или «шипики». [Horne R. W. et al., The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques, Virology, 11, 79 (1960).]

животных-хозяев или патологическое воздействие вируса на культуру ткани.

Любым из перечисленных выше методов можно пользоваться для тестирования фракций, получающихся на каждом этапе проведения очистки вируса. Если препарат вируса в достаточной степени очищен, то число содержащихся в нем вирусных частиц можно непосредственно подсчитать под электронным микроскопом. При этом обычно оказывается, что число *инфекционных единиц* существенно меньше числа тех частиц, которые выявляются морфологически. Отношение инфекционных единиц к видимым частицам варьирует от 10^{-1} для одних вирусов и вплоть до 10^{-4} или даже 10^{-5} для других.

РАЗМНОЖЕНИЕ ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

АДСОРБЦИЯ И ПРОНИКНОВЕНИЕ

Адсорбция вирусов животных на клетке-хозяине начинается с того, что между участками адсорбции на поверхности вириона и рецепторными участками на поверхности клетки образуются нековалентные связи.

У разных вирусов участки адсорбции различны по своей природе. У аденовирусов, например, каждый расположенный в вершинах икосаэдрического вириона пентамер несет маленькую нить; эти нити и служат органами адсорбции. У многих вирусов, имеющих оболочку, органами адсорбции служат многочисленные шипики, которыми усеяна поверхность оболочки (рис. 12.21). Рецепторные участки на поверхности клеток-хозяев также бывают разными. Например, рецепторы для миксовирусов состоят из мукопротеидов, а рецепторы для полиовирусов — из липопротеидов.

Вслед за адсорбцией происходит целый ряд событий, в том числе *прохождение* вириона через мембрану клетки и его «раздевание». В результате в цитоплазме клетки-хозяина

оказывается свободная нуклеиновая кислота вируса. Точная последовательность всех этих событий пока неясна и, по-видимому, для разных вирусов неодинакова. Иногда «раздевание» вириона может начинаться тогда, когда он еще прикреплен к мембране, как это, по-видимому, имеет место в случае полиовируса. В других случаях (например, вирус оспы) частично «раздевание» происходит под действием лизосомных ферментов на вирионы, содержащиеся внутри фагоцитозных вакуолей. Иногда весь процесс «раздевания» протекает внутри цитоплазмы.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАЗВИТИЕ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

Внутриклеточное развитие вируса начинается с транскрипции «ранних» генов вируса и трансляции образующихся мРНК. Продуктами этих генов являются ферменты, которые необходимы для репликации вирусной ДНК. У большинства ДНК-содержащих вирусов ранняя транскрипция происходит в ядре и осуществляется *хозяйской транскриптазой* (ДНК-зависимой РНК-полимеразой). Исключение составляют поксвирусы, вирионы которых содержат свою собственную транскриптазу. После «раздевания» вирусная транскриптаза активируется, и в цитоплазме клетки-хозяина синтезируется «ранняя» информационная РНК.

Ранняя вирусная информационная РНК транслируется рибосомами клетки-хозяина, и образуются ферменты, которые обеспечивают репликацию вирусной ДНК. Репликация вирусной ДНК всегда, за исключением поксвирусов, происходит в ядре клетки. ДНК реплицируется полуконсервативно и симметрично. С помощью ультрацентрифугирования экстрактов клеток показано, что вирусная ДНК ассоциирована с частицами, содержащими липиды; это служит указанием на то, что в процессе репликации она может быть связана с мембраной.

Некоторое время спустя после начала репликации ДНК происходит транскрипция «поздних» генов вируса, трансляция образованных РНК и синтез белков капсида. Как и в случае бактериофагов, происходит самосборка капсидных белков и молекул нуклеиновой кислоты и формирование зрелых нуклеокапсидов.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАЗВИТИЕ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

В общих чертах внутриклеточное развитие РНК-содержащих вирусов животных подобно развитию ДНК-содержащих вирусов. Начинается оно с синтеза информационных цепей РНК, которые затем транслируются с образованием как ферментов репликации, так и капсидных белков. Далее происходит репликация вирусной нуклеиновой кислоты, и наконец

процесс созревания завершается самосборкой нуклеокапсидов. В зависимости от группы, к которой относится РНК-содержащий вирус, синтез информационной РНК может идти тремя разными способами. У одной из групп — пикорнавирусов — полигенной информационной РНК служит сама вирионная РНК. После «раздевания» она сразу же транслируется рибосомами хозяина, и в результате образуется единый гигантский полипептид, который расщепляется на несколько вирусных белков. Затем та же молекула РНК, но уже свободная от рибосом, может реплицироваться, как описано ниже.

У всех других групп РНК-содержащих вирусов, за исключением лейковирусов (РНК-содержащих онкогенных вирусов), информационная нить РНК *комплементарна* той нити РНК, которая входит в состав вириона, и она образуется с помощью ассоциированной с вирионом РНК-зависимой РНК-полимеразы. В результате копирования вирионной РНК образуется ряд моноистронных информационных РНК, каждую из которых рибосомы хозяина транслируют в вирусный белок одного определенного типа. В этом случае различие между «ранними» и «поздними» мРНК отсутствует.

Совершенно иной механизм образования информационной РНК действует у лейковирусов. В этом случае в вирионе содержится полимеразы, которая использует вирионную РНК как матрицу для синтеза *комплементарной цепи* ДНК. Затем происходит репликация этой ДНК и образуется двухцепочечная ДНК. Катализирующий эту реакцию ассоциированный с вирионом фермент представляет собой *РНК-зависимую ДНК-полимеразу* и называется *обратной транскриптазой*. И молекулы информационной РНК, и новые вирионные молекулы РНК синтезируются, по-видимому, на двухцепочечной ДНК-матрице обычными ДНК-зависимыми РНК-полимеразами. Значение такой промежуточной ДНК для онкогенеза (образования опухолей) будет обсуждаться ниже.

У неонкогенных РНК-содержащих вирусов один из вирусных белков, транслированных с вирусной информационной РНК, представляет собой вирусную *репликазу* (РНК-зависимую РНК-полимеразу), осуществляющую синтез новых цепей вирионной РНК (которые мы обозначаем здесь знаком «+»). Этот процесс подобен тому, который был описан ранее для РНК-содержащих фагов, и включает образование сначала двухцепочечной (+/—) промежуточной формы РНК. Комплементарная минус-цепь (—) этой промежуточной формы служит затем матрицей в многократном синтезе новых вирионных (+) цепей. И в этом случае опять формирование частиц происходит путем самосборки молекул нуклеиновой кислоты (в данном случае РНК) и капсидных белков с образованием нуклеокапсидов.

193 Следует вспомнить, что вирионы одного класса вирусов (реовирусов) содержат двухцепочечную РНК. При внутри-

клеточном развитии этих вирусов происходят те же описанные выше процессы, но в ином сочетании. Ассоциированная с вирионом полимеразы использует вирионную РНК в качестве матрицы для синтеза одноцепочечных информационных молекул РНК, комплементарных одной из родительских цепей. Образованная в результате трансляции вирусной информационной РНК вирусная репликаза превращает информационную РНК в двухцепочечную форму, которая и включается в вирионы потомства.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ У ВИРУСОВ ЖИВОТНЫХ

Для многих вирусов животных характерно явление генетической рекомбинации: смешанное заражение двумя генетически маркированными вирусами может дать потомство, которое наследует маркеры от обоих родителей. В качестве маркеров в этих исследованиях использовались такие мутантные признаки, как измененная морфология бляшек, устойчивость к ингибиторам или измененный спектр хозяев. Существование рекомбинации показано для нескольких групп ДНК-содержащих вирусов, а также для двух РНК-содержащих вирусов, вируса гриппа (миксовирус) и полиовируса (пикорнавирус). В случае вируса гриппа, когда вирион содержит несколько разных молекул РНК, рекомбинация отражает тот факт, что в процессе сборки зрелого вириона молекулы РНК распределяются по частицам случайным образом. На основании данных, полученных на полиовирусе, был сделан вывод, что при рекомбинации происходит спаривание молекул РНК с последующим разрывом и воссоединением цепей, т. е. рекомбинация молекул РНК происходит по механизму, аналогичному механизму рекомбинации молекул ДНК.

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ВИРИОНОВ ИЗ КЛЕТКИ

Существуют два основных механизма высвобождения вирионов вирусов животных из клетки. У одних вирусов нуклеокапсид выводится из клетки с помощью почкования, так что вирусная частица приобретает наружную оболочку, происходящую из клеточной мембраны (рис. 12.5). Перед отпочковыванием в мембрану клетки включаются некоторые вирусные белки, так что оболочка вируса содержит как вирусный материал, так и материал клетки-хозяина. Однако все липиды оболочки происходят из мембраны хозяина.

Другие вирусы выходят из клетки через брешы в мембране; нуклеокапсиды свободных вирионов этих вирусов лишены оболочки. Когда вирус выходит из клетки таким способом, клетка обычно погибает, а в среде сразу появляется большое количество вирусных частиц. Напротив, если вирионы формируются путем почкования, то клетка-хозяин не обязательно погибает сразу же, и процесс высвобождения вирио-

нов может в этом случае продолжаться в течение многих часов. В некоторых случаях клетки-хозяева в ходе этого процесса продолжают делиться и живут неограниченно долго. Это приводит к *установившейся инфекции* — возникает клон, все клетки которого непрерывно выделяют вирусные частицы. Для поддержания такой установившейся инфекции совсем не нужно повторного заражения клеток внеклеточным вирусом, поскольку при делении каждая дочерняя клетка приобретает внутрицитоплазматические вирусные частицы.

ОНКОГЕННЫЕ ВИРУСЫ

ОТКРЫТИЕ РОЛИ ВИРУСОВ В ЭТИОЛОГИИ ОПУХОЛЕЙ

Обычные ткани животных образуются в результате *регулируемого, ограниченного* роста клеток. Однако изредка клетка может выйти из-под регуляторного контроля и начать неограниченно делиться, образуя ненормально разрастающуюся ткань. Такие разрастания называют *опухольми* или *новообразованиями*.

Некоторые опухоли, например большинство папиллом (бородавок), являются *доброкачественными*. Они остаются локальными и не причиняют животному вреда. Другие оказываются *злокачественными*. Они характеризуются инвазивным ростом, и в результате тот орган, в котором они возникли, повреждается, а животное погибает. Часто вышедшие из-под контроля клетки покидают опухоль и образуют новые очаги в других частях тела. Злокачественную опухоль нередко называют *раком*.

Обычно опухоли называют по той ткани, в которой они образуются, добавляя к названию ткани суффикс -ома, например лимфома, миома, саркома, аденома и так далее. Однако злокачественную опухоль кроветворной системы («рак крови») принято называть *лейкозом*.

Первое указание на связь между вирусами и раком было получено в 1908 г., когда В. Эллерман (V. Ellerman) и О. Банг (O. Bang) показали, что здоровых кур можно заразить некоторыми видами лейкемии, вводя им не содержащие клеток фильтраты крови больных лейкемией кур. Через несколько лет П. Раяс (P. Rous) показал, что аналогичным образом можно у кур передавать саркому. В то время на эти открытия внимания не обратили. Только в 1932 г., когда Р. Шоуп (R. Shope) доказал, что папиллома кроликов имеет вирусное происхождение, была признана та роль, которую играют вирусы в индукции опухолей.

Важным этапом явилось выявление *природных путей передачи* индуцированного вирусами рака. В 1936 г. Дж. Биттнер (J. Bittner) показал, что рак молочных желез у мышей вызывается вирусом, который передается потомству с мо-

локом матери. Работа Биттнера привела к пониманию некоторых важных аспектов индуцируемого вирусами рака. Во-первых, оказалось, что у животного, зараженного онкогенным вирусом при рождении, опухоль может развиваться лишь по достижении им зрелого возраста. Во-вторых, способность вируса индуцировать образование опухоли зависит от определенных внешних факторов (например, от физиологии хозяина), и с высокой частотой индукция происходит только у тех животных, которые подвергаются характерной для беременности гормональной стимуляции. Такие опухоли могут развиваться даже у самцов мышей, зараженных вирусом, если им в течение длительного времени вводился гормон эстрадиол.

ТРАНСФОРМАЦИЯ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ОПУХОЛЕВЫЕ

Индукцию опухоли вирусом *in vivo* можно воспроизвести и в культурах ткани. Если чувствительную культуру ткани заразить опухолеродным вирусом, то некоторые зараженные клетки приобретают способность к нерегулируемому росту.

Этот процесс, который был назван *трансформацией*¹, вызывает ряд поразительных изменений в свойствах клетки. Большинство клеток животных в культуре ткани проявляют *контактное торможение*. Такие клетки передвигаются более или менее случайно посредством амебоидного движения и делятся последовательно до тех пор, пока не приходят в контакт друг с другом. Контакт между клетками подавляет как движение клеток, так и их деление. В результате нормальные клетки образуют на поверхности стеклянного сосуда монослой. Трансформированные же клетки не проявляют контактного торможения и образуют в культуре ткани опухолевидные скопления. Более того, те клетки, которые были трансформированы в культуре ткани, вызывают опухоли при их введении в животное-хозяина.

Эффективность трансформации сильно варьирует в зависимости от вируса. Например, вирус саркомы Рауса трансформирует практически каждую зараженную им клетку. Другие онкогенные вирусы могут трансформировать лишь одну из 10^3 — 10^5 зараженных клеток. Чтобы наблюдать трансформацию, необходимо предотвратить летальное действие вируса. Для этого можно использовать непермиссивные клетки-хозяева, т. е. клетки такого животного, которое не способно поддерживать летальную вирусную инфекцию. Например, вирус полиомы летально инфицирует клетки почки или эмбриональные клетки мыши, но не клетки крысы или хомячка. Последние являются для вируса полиомы непермиссивными и трансформируются им, хотя и с низкой эффективностью.

¹ Термин «трансформация» используется в биологии также и для обозначения совершенно иного процесса — образования рекомбинантных бактерий путем включения выделенной из донорных клеток ДНК (см. гл. 15).

Онкогенные (опухолеродные) вирусы обнаружены среди нескольких групп ДНК-содержащих вирусов — аденовирусов, герпесвирусов, поксвирусов и папавирусов. Многие экспериментальные работы по изучению механизма образования опухолей проведены с вирусами, относящимися к этой последней группе. В эту группу входят вирусы полиомы (вызывающие разнообразные опухоли у новорожденных мышей), вирусы папилломы (вызывающие доброкачественные бородавки у человека и млекопитающих) и обезьяний вирус SV40, который был выделен из культур клеток макака-резуса, использовавшихся для размножения полиовируса при производстве вакцины.

Основное внимание было уделено вирусу полиомы, что обусловлено его небольшими размерами: ДНК этого вируса кодирует всего лишь пять белков. С помощью тестов на комплементацию между термочувствительными мутантами (этот тест описан в гл. 13) было показано, что геном этого вируса действительно содержит пять генов. Два из них, которые транскрибируются на поздней стадии инфекции, контролируют образование капсида, а два других гена, транскрибирующихся в начале инфекции, участвуют в процессе трансформации. Продукт одного из этих ранних генов, вероятно, участвует в интеграции вирусной ДНК с геномом хозяина (см. ниже). Продукт другого раннего гена участвует, по-видимому, в тех изменениях, которые выводят клетку-хозяина из-под нормального контроля и придают ей свойства, характерные для трансформированного состояния.

Из РНК-содержащих вирусов вызывать опухоли способны лишь ограниченная группа — вирусы лейкемии, лимфомы и саркомы мышей, кошек и кур, а также вирус рака молочных желез мышей. Все они близки по своим физико-химическим свойствам и объединяются в группу *лейковирусов*. Способность этих вирусов вызывать опухоли связана, видимо, с характерным для них уникальным способом репродукции. С вирионами этих вирусов ассоциирована обратная транскриптаза, которая образует ДНК-копию вирионной РНК. Эта ДНК-копия способна переходить в состояние провируса, встраиваясь, вероятно, в геном хозяина (см. ниже).

СОСТОЯНИЕ ГЕНОМА ВИРУСА В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

После того как трансформация, вызванная ДНК-содержащим вирусом, прошла, в клетках индуцированной опухоли или в трансформированных клетках культуры ткани инфекционных частиц вируса уже не обнаруживается. Тем не менее можно показать, что в трансформированной клетке присутствует и при каждом ее делении воспроизводится по крайней мере часть, а может быть, и весь геном вируса. На-

пример, если выращивать трансформированные клетки вместе с обычными чувствительными клетками в таких условиях, которые способствуют слиянию клеток, то можно наблюдать появление свободных вирусных частиц. Следовательно, происходящее в таких случаях слияние трансформированной клетки с нормальной приводит к полному выражению латентного вирусного генома.

Присутствие в опухолевой клетке по крайней мере части вирусного генома можно выявить двумя способами. Во-первых, можно показать, что трансформированные клетки содержат вирусные антигены, т. е. белки, которые кодируются генами вируса. Природа этих антигенов неизвестна, но это не белки капсида. Во-вторых, с помощью гибридизации нуклеиновых кислот можно показать, что трансформированные клетки содержат вирусную ДНК.

В случае некоторых ДНК-содержащих онкогенных вирусов показано, что вирусная ДНК *встраивается в ДНК клетки-хозяина*. Если провести фракционирование ДНК трансформированных клеток и с помощью гибридизации нуклеиновых кислот определить в ней содержание последовательностей вирусной ДНК, то окажется, что эти последовательности ковалентно связаны с последовательностями хозяйской ДНК. Такие опыты показали, что в каждой такой клетке присутствует более одной копии вирусного генома.

Данные об интеграции ДНК, образованной обратной транскриптазой, и комплементарной РНК онкогенного вируса более косвенны. Такие последовательности вирусной ДНК обнаружены, например, в ядрах лейкемических клеток, но прямых данных о том, что они ковалентно связаны с ДНК хозяйской клетки, пока нет. Однако, поскольку в вирионах опухолеродных вирусов присутствуют ДНК-специфические лигазы и нуклеазы (ферменты, которые могли бы осуществлять встраивание генома вируса в ДНК хозяина путем разрывов и воссоединений), предполагается, что такое встраивание вирусной ДНК в геном хозяина действительно имеет место.

Так как онкогенные вирусы способны переходить в *состояние провируса*, это означает, что они могут передаваться двумя способами: *горизонтально*, когда вирус передается от клетки к клетке посредством высвобождения вирионов из клетки и их адсорбции на других клетках, и *вертикально*, когда вирус передается от поколения к поколению в виде провируса. Если вирус попадает в клетку зародышевого пути животного, он может быть передан вертикально следующему поколению животных. Эта возможность лежит в основе многих теорий этиологии рака, которые будут обсуждаться ниже.

СХОДСТВО МЕЖДУ ТРАНСФОРМАЦИЕЙ ВИРУСОМ И ЛИЗОГЕНИЕЙ

198 Поразительно то сходство, которое имеется между трансформацией вирусами животных и лизогенизацией бактериофага-

ми, описанной ранее в этой главе. В обоих случаях клетка-хозяин в результате заражения приобретает латентный геном вируса, или провирус, который реплицируется как часть генома хозяина или по крайней мере синхронно с ним. В обоих случаях один или несколько генов вируса продолжают оставаться активными, и это сообщает клетке новые свойства. Так, изменяются некоторые *свойства поверхности* клетки-хозяина: лизогенная бактерия может приобрести новый поверхностный антиген, а трансформированные клетки животных утрачивают способность к контактному торможению.

Существует, однако, по крайней мере одно важное различие между трансформацией и лизогенией. Как мы уже говорили, поддержание лизогенного состояния обусловлено тем, что в клетке постоянно образуется фаговый *репрессор*, включающий функционирование почти всех генов фага. Данных о существовании репрессоров в трансформированных клетках животных нет. Наоборот, продуктивная инфекция не происходит, по-видимому, именно потому, что у непермиссивного хозяина отсутствуют какие-то факторы, необходимые для развития вируса¹.

РОЛЬ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ В ИНДУКЦИИ РАКА У ЧЕЛОВЕКА

Установлено, что этиологическими агентами рака, встречающегося у животных *в природе*, могут быть ДНК-содержащие вирусы, относящиеся к двум группам. Это *папилломавирусы*, которые вызывают злокачественные бородавки у кроликов, доброкачественные бородавки у других животных и у человека, а также *герпесвирусы*, вызывающие лимфому у кур (болезнь Марека) и аденокарциному почек у лягушек.

Многие обнаруженные в тканях человека вирусы (например, аденовирусы) могут вызывать опухоли при введении их животным, однако до сих пор из опухолей человека выделено лишь небольшое число онкогенных вирусов. Главным исключением из этого правила является один из герпесвирусов, названный вирусом *Эпштейна—Барра* (вирус ЭБ). Этот вирус был выделен впервые из летальной формы рака человека — лимфомы Бэркитта, и, по-видимому, идентичный вирус был позднее выделен из клеток карциномы носоглотки человека. Вирусы ЭБ являются настоящими онкогенными вирусами и при введении их обезьянам приводят к злокачественным лимфомам. Они оказывают также уникальное действие на лимфоциты приматов — единственный тип клеток, которые мо-

¹ Следует помнить, что каждая бактериальная клетка-хозяин может как пойти по пути литической инфекции, так и стать лизогенной. Исход в этом случае зависит от конкуренции между теми факторами, которые регулируют образование репрессора. Наоборот, клетки животных являются либо пермиссивными, либо непермиссивными хозяевами. Данный вирус всегда латентен для пермиссивного хозяина и трансформирует непермиссивного.

гут быть экспериментально заражены вирусом ЭБ. Зараженные этим вирусом клетки «трансформируются» и приобретают способность к непрерывному росту в культуре и способность вызывать у обезьян злокачественные опухоли.

Недавно, однако, было обнаружено, что вирус ЭБ в латентном состоянии присутствует в лимфоцитах значительной части населения США, не вызывая явных признаков болезни. Свободные вирионы ЭБ обнаружены в гортани людей, больных инфекционным мононуклеозом (болезнь, не относящаяся к злокачественным новообразованиям), а в крови этих больных в высоком титре присутствуют антитела против этого вируса. Таким образом, вирус ЭБ в латентной форме присутствует у многих здоровых людей, но высвобождается из клеток в виде зрелых вирионов лишь у тех, кто страдает лимфомой Беркитта или карциномой носоглотки, а также у больных инфекционным мононуклеозом. Все эти вирусы ЭБ не удается отличить друг от друга с помощью существующих лабораторных методов исследования. Их ДНК хорошо гибридизуются друг с другом, и они образуют идентичные антигены. Однако эти вирусы могут представлять собой генетически различные штаммы с разной патогенностью.

Несмотря на то что вирусы ЭБ ассоциированы с болезнями человека, им нельзя приписать этиологической роли ни в инфекционном мононуклеозе, ни в индукции опухолей у человека. Если они действительно играют роль в возникновении этих болезней, то неясно, почему они вызывают болезнь лишь у незначительной части людей среди тех, у кого они встречаются. Возможно, в индукции опухолей, ассоциированных с вирусом ЭБ, участвуют другие типы вирусов (так, в клетках лимфомы Беркитта обнаружен РНК-содержащий вирус).

Тот факт, что из опухолей человека не выделено других ДНК-содержащих онкогенных вирусов, вовсе не исключает их возможной роли в возникновении рака. Во-первых, отсутствие эпидемиологических данных об инфекционности не может считаться убедительным, так как опыт работы с онкогенными вирусами на экспериментальных животных показывает, что от инфекции до возникновения опухоли может пройти очень длительное время. Во-вторых, не исключено, что ДНК-содержащие онкогенные вирусы передаются *вертикально* от родителя к детям, вызывая рак только тогда, когда под действием определенных внешних факторов, например канцерогенов или облучения, активируются гены вируса, ответственные за трансформацию.

РОЛЬ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ В ИНДУКЦИИ РАКА У ЧЕЛОВЕКА

200 Показано, что РНК-содержащие онкогенные вирусы вызывают многие формы рака у животных, в том числе лейке-

мии, саркомы и лимфомы у мышей, кошек и кур, опухоли молочных желез у мышей. Каждое из этих заболеваний имеет свои аналоги у человека. Используя очень чувствительную методику, С. Спигелман (S. Spiegelman) с сотрудниками исследовали экстракты из опухолевых тканей человека на присутствие в них РНК-содержащих вирусов, родственных этиологическим агентам соответствующих заболеваний животных.

Эти исследователи искали частицы, которые обладали бы следующими свойствами. 1. Их плавающая плотность должна соответствовать плавающей плотности, характерной для РНК-содержащих опухолеродных вирусов. 2. В них должна содержаться 70S-РНК, типичная для РНК-содержащих онкогенных вирусов. 3. В них должна присутствовать обратная транскриптаза. 4. Эта обратная транскриптаза должна быть способна синтезировать ДНК, комплементарную 70S-РНК. 5. ДНК, образованная обратной транскриптазой, должна быть гомологична РНК онкогенного вируса, вызывающего аналогичного типа рак у животных.

Во всех изученных случаях поиски оказались успешными. Например, обладающие перечисленными выше свойствами частицы были обнаружены в лейкоэмических клетках человека, но не выявлялись в нормальных клетках. ДНК, синтезированная эндогенно этими частицами, гибридизовалась с РНК вируса лейкемии мышей, но не с РНК других РНК-содержащих онкогенных вирусов. Такая же гомология была обнаружена между РНК частиц, выделенных из опухоли молочных желез человека, лимфом и сарком человека, и РНК тех вирусов, которые вызывают аналогичные формы рака у мышей.

Спигелман с сотрудниками пошли дальше и попытались выяснить, нельзя ли выделить подобные частицы из таких опухолей человека, для которых нет аналогов у животных. Были приготовлены экстракты из опухолей мозга, легкого и желудочно-кишечного тракта человека, и во всех случаях были обнаружены частицы, которые обладали всеми перечисленными выше свойствами. (Конечно, последний тест — на гомологию с РНК известного онкогенного вируса животного — для РНК этих частиц провести было невозможно).

Вопрос о том, действительно ли обнаруженные в опухолях человека РНК-содержащие частицы играют роль в этиологии рака, окончательно не решен, так как до сих пор не показано, что эти частицы инфекционны или онкогенны. Однако в пользу их онкогенности говорит то, что их нуклеотидные последовательности гомологичны последовательности РНК-содержащих вирусов, вызывающих аналогичные опухоли у животных.

Даже если будет доказано, что РНК-содержащие вирусы действительно несут гены, определяющие злокачественное состояние, вопрос о происхождении и передаче этих вирусов

останется нерешенным. За редкими исключениями, которые считаются артефактами, обнаруженные в опухолях РНК-содержащие вирусы обладают низкой инфекционностью. Те же РНК-содержащие вирусы, которые все-таки инфекционны и способны индуцировать опухоли, индуцируют их с очень низкой эффективностью. На основании этих фактов, а также исходя из того, что онкогенные вирусы способны переходить в состояние провируса и передаваться вертикально, были развиты три разные теории о связи РНК-содержащих вирусов с раком¹. Это теория провируса, теория онкогена и теория протовируса.

Из этих теорий самой простой и прямой является *теория провируса*. В соответствии с ней РНК-содержащие онкогенные вирусы передаются горизонтально от организма к организму и переходят в состояние провируса. Эти вирусы вызывают рак, но образуется он не сразу после заражения, а несколько позднее в результате случайной активации тех генов провируса, которые определяют трансформацию. Изредка они могут передаваться и вертикально. По теории провируса геномы РНК-содержащих опухолеродных вирусов должны обнаруживаться лишь у части человеческой популяции.

Теория онкогена, которая была разработана Р. Хюбнером (R. Huebner) и Г. Тодаро (G. Todaro), отражает иную точку зрения. В соответствии с этой теорией в результате инфекции и интеграции провируса или в результате эндогенного генетического изменения на ранней стадии эволюции человека создан определенный набор генов, совместная активность которых приводит к образованию РНК-содержащего вируса. Данный набор генов был назван в совокупности *виrogenом*; он включает один или несколько генов, активность которых приводит к злокачественной трансформации. Этот ген (или гены), ответственный за трансформацию, был назван *онкогеном*.

Таким образом, предполагается, что виrogen и входящий в его состав онкоген присутствуют в каждой клетке каждого человека и сохранились в течение всей эволюции человека потому, что они выполняют какую-то важную функцию. Например, возможно, онкоген играет роль в эмбриогенезе. И действительно, антитела против некоторых опухолевых антигенов перекрестно реагируют с определенными антигенами нормальных эмбриональных тканей. При обычных условиях активность некоторых или даже всех генов, необходимых для развития вируса и для злокачественности, подавлена, но они могут дерепрессироваться под влиянием внешних факторов (таких, как химические или физические канцерогены). Де-

202 ¹ Вирусогенетическая концепция возникновения опухолей была предложена еще в 1945 г. советским ученым Л. А. Зильбером. — *Прим. ред.*

репрессия может привести к образованию вирионов, к злокачественности или и к тому, и к другому одновременно.

В гипотезу онкогена поверили, когда было показано, что некоторые агенты, например бромдезоксинуридин, индуцируют появление вирионов во многих типах как нормальных, так и злокачественных клеток. Под электронным микроскопом эти вирионы выглядят так же, как и вирионы РНК-содержащих онкогенных вирусов. Онкогенность этих так называемых эндогенных вирусов не доказана. В действительности многие из них не способны развиваться ни в той ткани, из которой они были выделены, ни в культуре клеток из других видов. Тем не менее тот факт, что после индукции они появляются во многих типах клеток, указывает на то, что все клетки животных и человека содержат геномы РНК-содержащих вирусов, возможно в виде синтезированных обратными транскриптазами ДНК провирусов.

Теории провируса и онкогена приводят к разным выводам относительно состава ДНК в нормальных и опухолевых тканях. Согласно первой теории, участки, комплементарные последовательностям РНК-содержащих опухолеродных вирусов, должны содержаться в ДНК опухолевой ткани, но их не должно быть в ДНК нормальной ткани. Напротив, по второй теории такие участки должны присутствовать в ДНК всех клеток, а различие между нормальными и раковыми клетками заключается в проявляемой генами активности, а не в присутствии или отсутствии самих генов.

Группа Спигелмана проверила эти предсказания теории, проведя исследование ДНК лейкоэмических клеток и нормальных лейкоцитов человека на присутствие таких уникальных последовательностей. Было обнаружено, что в ДНК лейкоэмических клеток имеются участки, комплементарные последовательностям 70S-РНК тех частиц, о которых мы говорили ранее, — частиц, которые содержат обратную транскриптазу и РНК которых гомологична по последовательности РНК вируса лейкемии мышей. В то же время в составе ДНК нормальных лейкоцитов таких участков обнаружено не было. Это подтверждает провирусную гипотезу, по крайней мере в отношении лейкемии человека.

Теория протовируса была разработана Г. Темином (H. Temin), который одновременно с Д. Балтимором (D. Baltimore) открыл обратные транскриптазы РНК-содержащих опухолеродных вирусов. Темин предположил, что обратные транскриптазы, которые теперь обнаружены уже как в зараженных, так и в незараженных клетках, играют какую-то роль в нормальном эмбриогенезе. В соответствии с этой теорией, некоторые гены (протовирусы) в нормальной клетке при дупликации сначала транскрибируются с образованием РНК и далее с помощью обратной транскриптазы опять превращаются в последовательности ДНК. Затем эти дублированные

ные сегменты вновь встраиваются в геном, но уже в новые его участки. (Такое встраивание может происходить в геном той же самой клетки или после переноса дублированного сегмента в соседнюю клетку). В результате создаются новые последовательности генов. Эти новые последовательности придают клетке новые функции в рамках нормального развития. Однако иногда в этом процессе случаются ошибки, и в результате может создаться необычный набор генов, выражение которых приводит к появлению РНК-содержащих вирусов или к злокачественности, или к тому и к другому одновременно. Следовательно, согласно теории протовируса, РНК-содержащие онкогенные вирусы возникают *de novo* как нарушение нормальной дифференцировки клеток. Сформировавшись однажды, они могут передаваться горизонтально и действовать в качестве опухолеродных вирусов. Однако представляется, что рак возникает преимущественно из-за нарушений в нормальном процессе развития.

Теория протовируса поддается прямой экспериментальной проверке. Если, например, можно будет доказать, что те частицы, которые, как обнаружил Спигелман и его сотрудники, постоянно присутствуют в раковых тканях, онкогенны, то тем самым будет доказана их роль в этиологии рака. По этическим соображениям такие опыты на *человеке* провести нельзя, но для этого можно использовать лабораторных животных, в том числе и приматов. Таким образом, даже в случае положительного результата эти опыты не смогут доказать роль вирусов в возникновении рака у человека. Однако, если окажется, что геном данного вируса *не присутствует* в ДНК опухолевых клеток, этот вирус уже *нельзя* будет считать причиной возникновения данного типа рака.

Гипотезы онкогена и протовируса проверить труднее. Для этого надо показать, что все нормальные клетки либо несут гены для образования РНК-содержащих вирусов и опухолей, либо могут образовывать их посредством генных дупликаций и перестроек. Поэтому, хотя количество данных, указывающих на участие РНК-содержащих вирусов в этиологии по крайней мере некоторых видов рака у человека, непрерывно растет, вопрос об их действительной роли в этом процессе остается нерешенным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Caspar D. L. D., 1965, Design Principles in Virus Particle Construction, in Viral and Rickettsial Infections in Man, F. Horsfall and I. Tamm (eds.), Philadelphia, Lippincott.
- Fenner F., McAuslan B. R., Mimms C. A., Sambrook J., White D. O., 1974, The Biology of Animal Viruses, 2nd ed., New York, Academic Press.
- [Имеется перевод: Феннер Ф., Мак-Ослен Б., Мимс С. и др. Биология вирусов животных. — М.: Мир, 1977.]

- Hershey A. D. (ed.), 1971, The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory [Имеется перевод: Фаг лямбда/Под ред. А. Херши. — М.: Мир, 1975.]
- Tooze J. (ed.), 1973, The Molecular Biology of Tumour Viruses, Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

Обзоры

- Baltimore D. (1971), Expression of Animal Virus Genomes, Bact. Rev., 35, 235.
- Barksdale L., Arden S. (1974), Persisting Bacteriophage Infections, Lysogeny and Phage Conversions, Ann. Rev. Microbiol., 28, 265.
- Calendar R. (1970), The Regulation of Phage Development, Ann. Rev. Microbiol., 24, 241.
- Dales S. (1973), Early Events in Cell-Animal Virus Interactions, Bact. Rev., 37, 103.
- Diener T. O. (1974), Viroids: The Smallest Known Agents of Infectious Disease, Ann. Rev. Microbiol., 28, 23.
- Echols H. (1972), Developmental Pathways for the Temperate Phage: Lysis vs. Lysogeny, Ann. Rev. Genetics, 6, 157.
- Eckhart W. (1974), Genetics of DNA Tumor Viruses, Ann. Rev. Genetics, 8, 301.
- Fenner F. (1970), The Genetics of Animal Viruses, Ann. Rev. Microbiol., 24, 297.
- Herskowitz I. (1973), Control of Gene Expression in Bacteriophage Lambda, Ann. Rev. Genetics, 8, 289.
- Joklik W. K., Zweerink H. J. (1971), The Morphogenesis of Animal Viruses, Ann. Rev. Genetics, 5, 297.
- Lemke P. A., Nash C. H. (1974), Fungal Viruses, Bact. Rev., 3, 29.
- Lwoff A., Horne R., Tournier P. (1962), A System of Viruses, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 27, 51.
- Padan E., Shilo M. (1973), Cyanophages — Viruses Attacking Blue-Green Algae, Bact. Rev., 37, 343.
- Sambrook J. (1972), Transformation by Polyoma Virus and SV40, Adv. Cancer Res., 16, 141.
- Temin H. M. (1974), On the Origin of RNA Tumor Viruses, Ann. Rev. Genetics, 8, 155.
- Temin H. M., Baltimore D. (1972), RNA-Directed DNA Synthesis and RNA Tumor Viruses, Adv. Virus Res., 17, 129.
- Valentine R., Ward R., Strand M. (1969), The Replication Cycle of RNA Bacteriophages, Adv. Virus Res., 15, 1.

Оригинальные работы

- Baxt W. G., Spiegelman S. (1972), Nuclear DNA Sequences Present in Human Leukemic Cells and Absent in Normal Leukocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 69, 3737.
- Marvin D. A., Wachtel E. J. (1975), Structure and Assembly of Filamentous Bacterial Viruses, Nature, 253, 19.
- Molyneux D. H. (1974), Viruslike Particles in *Leishmania* Parasites, Nature, 249, 588.

13 МУТАЦИИ И ДЕЙСТВИЕ ГЕНА НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

Генетические исследования перешли на молекулярный уровень в 1953 г., когда Дж. Уотсон и Ф. Крик выдвинули свою гипотезу о структуре ДНК. Особое значение предложенной ими модели заключается в том, что она объясняет репликацию ДНК и механизм мутаций на молекулярном уровне. Поскольку данные процессы лежат в основе наследственности и изменчивости, можно смело сказать, что во всей истории биологии по своему значению с этим открытием может сравниться только созданная Дарвином теория эволюции:

Модель структуры ДНК Уотсона и Крика и следствия из нее знакомы теперь всем студентам-биологам; эта тема вкратце обсуждалась в гл. 7. Основываясь на имеющихся представлениях, можно определить ген и мутацию в точных молекулярных терминах. *Ген* — это *участок ДНК, последовательность оснований которого определяет в процессе транскрипции последовательность оснований в молекуле РНК, а затем при трансляции — последовательность аминокислот в полипептидной цепи*. *Мутация* — это *любое стабильное изменение последовательности оснований ДНК, которое может даже не оказывать заметного влияния на фенотип*¹.

Хотя полипептиды сильно различаются по длине, большинство из них, размер которых точно измерен, имеют молекулярный вес от 30 000 до 40 000, что соответствует цепи из 250—300 аминокислотных остатков. Если мы примем среднюю длину полипептидной цепи равной 300 аминокислотным остаткам, то, учитывая триплетность кода, получим, что ген должен содержать в среднем около 1000 пар нуклеотидов.

Из-за мутационных замен в последовательности нуклеотидов каждый ген существует в виде ряда форм; различные мутантные формы гена называются *аллелями*. Та форма, в которой данный ген существует в микроорганизме, впервые выделенном из природной среды обитания (организм дикого типа), называется аллелем *дикого типа* этого гена; измененные в результате мутации формы называют *мутантными аллелями*.

¹ Понятие «ген» относят также к некоторым транскрибируемым, но не транслируемым участкам ДНК (таким, как гены, кодирующие транспортные и рибосомные РНК), а также к некоторым нетранскрибируемым и не-транслируемым участкам (таким, как операторные участки, описанные на стр. 227). Следует также отметить, что в случае РНК-содержащих вирусов гены представляют собой участки РНК, а не ДНК.

ТИПЫ МУТАЦИЙ

Последовательность нуклеотидов в гене может измениться при мутировании несколькими способами. Чаще всего встречаются замены пар оснований, мутации со сдвигом рамки и крупные делеции. При *замене* пара оснований в определенном месте аллеля дикого типа, например ГЦ-пара, замещается в мутантном аллеле на другую пару, например АТ или ЦГ. При мутациях *со сдвигом рамки* (frame-shift), названных так из-за сдвига порядка считывания в процессе трансляции (см. ниже), в определенном месте гена удаляются или вставляются одно или несколько оснований. При крупных делециях удаляется протяженная последовательность оснований, составляющая значительную часть гена. Крупные делеции необратимы; в отличие от них замещения пары оснований и мутации со сдвигом рамки обратимы.

МУТАГЕНЕЗ

Наши представления о механизмах мутаций получены в основном из экспериментов, в которых мутации индуцируются химическими веществами с известным способом воздействия на ДНК. К таким мутагенам относятся аналоги оснований, включающиеся в ДНК вместо обычных оснований; азотистая кислота, дезаминирующая пуриновые и пиримидиновые остатки в ДНК; акридины, которые встраиваются между плоскостями соседних пар оснований ДНК, увеличивая расстояние между ними с 3,4 до 6,8 Å; агенты, алкилирующие пуриновые и пиримидиновые основания по некоторым атомам азота в кольце.

Эксперименты, посвященные изучению химических механизмов мутаций, проводились почти исключительно на бактерии *Escherichia coli* и на ряде фагов, обычным хозяином которых является эта бактерия. В опытах с использованием нетоксичных мутагенов, например аналогов оснований, мутаген добавляют в ростовую среду и после ряда делений бактериальные клетки высевают на чашки со средой, позволяющей отобрать мутантов определенного класса. Выбор класса мутаций определяется только возможностями экспериментатора и стратегией эксперимента, так как *мутагены увеличивают частоту мутирования всех генов более или менее равномерно*. Скорость мутирования в присутствии мутагена можно определить разными способами (некоторые из них описаны в гл. 14); ее сравнивают со скоростью мутирования контрольной культуры в отсутствие мутагена.

В случае токсичных мутагенов чаще всего применяют 207 другой экспериментальный подход. Суспензию клеток обра-

батывают мутагеном в течение определенного промежутка времени, а затем клетки отмывают от мутагена и высевают на чашки со средой, позволяющей отобрать растущие мутантные клетки из популяции выживших клеток. Полученные результаты можно выразить количественно числом индуцированных мутантов в расчете на число выживших клеток.

Для выяснения механизма мутаций обычно осуществляют индукцию мутаций одним мутагеном и затем проверяют их способность к *реверсии*, т. е. обратному мутированию, под действием других мутагенов. Обычный метод определения числа реверсий — посев промытой суспензии мутантного штамма на агар для селектирования ревертантов; например, можно посеять ауксотрофные клетки на агар, позволяющий отобрать прототрофных ревертантов. Каплю раствора мутагена помещают непосредственно на чашку с агаром, так чтобы мутаген диффундировал по агару во все стороны, образуя градиент концентрации. Если мутанты способны ревертировать под действием данного мутагена, то вокруг капли возникнет кольцо колоний ревертантов (рис. 13.1).

Эксперименты по мутагенезу на бактериофагах проводятся в основном таким же образом. Химические вещества, способные модифицировать ДНК, добавляют непосредственно в суспензию фаговых частиц. Затем обработанные частицы высевают на газоны штаммов бактерий, необходимых для обнаружения частиц с мутантными свойствами, например с измененной морфологией бляшек или иным спектром хозяев. Вещества, необходимые для репликации, например аналоги оснований, добавляют в культуру клеток-хозяев, заражаемых фагом, а высвобождающееся фаговое потомство тестируют с помощью посева на газон подходящих бактериальных штаммов.

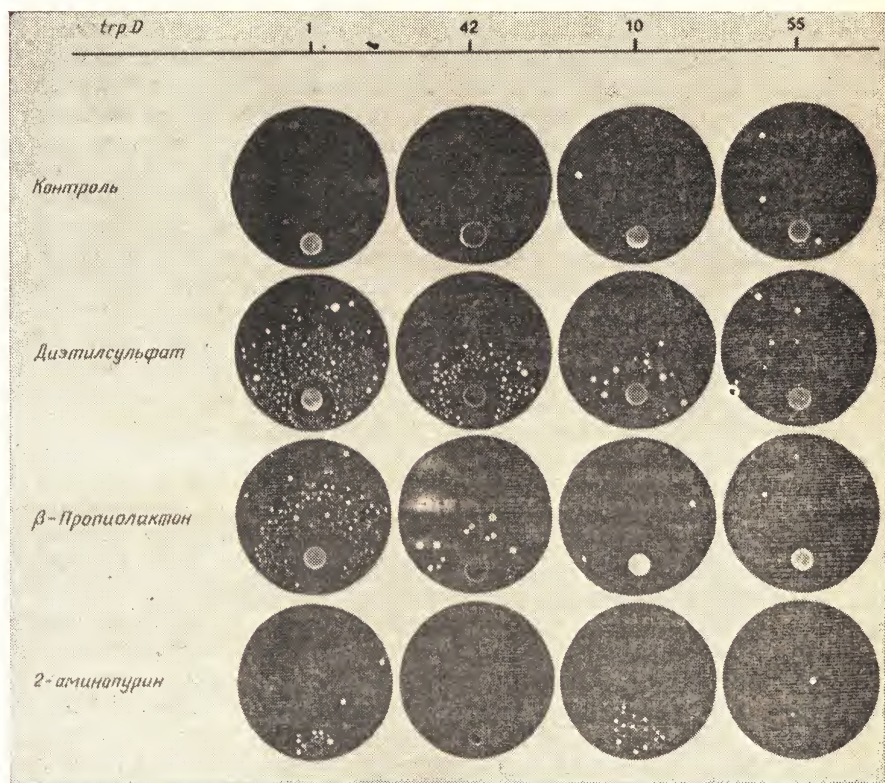
Молекулярная основа индуцированной мутагеном реверсии. Простые эксперименты по получению реверсий могут лишь показать, что *восстанавливается исходный фенотип*; если, например, в результате первичной мутации у штамма дикого типа была подавлена активность какого-либо фермента биосинтеза, то мутант, у которого функция этого фермента восстановлена, является ревертантом.

Такое восстановление функции фермента может происходить различными способами. Во-первых, за счет истинной обратной мутации, восстанавливающей исходную последовательность пар оснований. Если, например, в результате первичной мутации произошла замена пары оснований гуанин — цитозин (ГЦ) на пару аденин — тимин (АТ), то истинная обратная мутация приводит к восстановлению ГЦ-пары в этом положении. Во-вторых, восстановление функции фермента может происходить в результате замены на пару оснований, отличную и от исходной в штамме дикого типа, и

Рис. 13.1. Индукция генетической реверсии химическими мутагенами. На каждую из 16 чашек нанесли примерно $2 \cdot 10^8$ клеток триптофан-зависимого штамма *E. coli*. Агар содержал количество триптофана, достаточное примерно для десятикратного увеличения числа клеток; этого недостаточно для того, чтобы рост был заметен невооруженным глазом. На кружок фильтро-

вальной бумаги или в лунку в агаре помещали каплю раствора мутагена (или стерильной воды в качестве контроля). В горизонтальных рядах представлены препараты, обработанные указанным слева мутагеном, в вертикальных — различные мутации в локусе *trpD*. Отметим, что *trpD1* — мутация, обратимая всеми четырьмя мутагенами; *trpD42* обратима толь-

ко под действием диэтилсульфата и β -пропиолактона: *trpD10* обратима только диэтилсульфатом; *trpD55* не ревертирует под действием ни одного из использованных агентов. [Balbinder E., The fine structure of the loci *tryC* and *tryD* of *Salmonella typhimurium*. II. Studies of reversion patterns and the behavior of specific alleles during recombination, Genetics, 47, 545 (1962).]



от пары оснований, заместившей ее при первичной мутации; например, первичная мутация могла быть заменой ГЦ \rightarrow АТ, а обратная заменой АТ \rightarrow ЦГ (вместо АТ \rightarrow ГЦ). В этом случае ревертант отличается от дикого типа одной парой оснований, но активность фермента остается на нормальном уровне из-за вырожденности кода благодаря тому, что в данном положении у ревертанта находится та же аминокис-

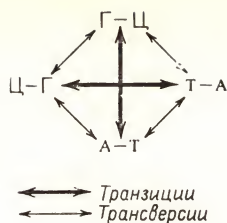


Рис. 13.2. Замещения пар оснований. Замещения, при которых пурины заменяются пурином или пиримидин — пиримидином, называются *транзигиями*. Замещения, при которых пурины заменяются пиримидином или наоборот, — *трансверсиями*.

лота, что и у дикого типа, или из-за того, что новая аминокислота в том же положении функционально эквивалентна аминокислоте дикого типа, которую она замещает.

Кроме того, реверсия может произойти благодаря второй мутации в другом сайте в том же или ином гене. Такие изменения в сайте, отличном от первого мутационного сайта, называются *супрессорными мутациями*. При *внутригенной супрессии* вторая мутация приводит к замене в аминокислотной последовательности, компенсирующей первую замену и восстанавливающей функцию фермента; при *внегенной супрессии* вторая мутация изменяет какой-либо компонент системы трансляции так, что ошибка кодирования, обусловленная первой мутацией, исправляется. Механизмы супрессии будут обсуждаться ниже в настоящей главе: здесь мы только отметим, что супрессорные мутации возникают сравнительно часто.

В большинстве опытов по выяснению механизмов мутаций адекватность интерпретации данных зависит от того, насколько твердо можно считать, что произошла *истинная обратная мутация*. При истинной обратной мутации фенотип ревертанта совершенно неотличим от фенотипа дикого типа и при скрещиваниях между ревертантом и диким типом невозможно получить выщепление исходной мутации; оно возможно лишь в том случае, если ревертант несет как первичную, так и супрессорную мутацию.

Поскольку оба эти критерия негативны (предполагается отсутствие различий фенотипов и невозможность выщепления первичной мутации), они не могут однозначно доказать, что произошла истинная обратная мутация. Тем не менее некоторые гипотезы о механизмах мутаций, предложенные на основании экспериментов по обратным мутациям, были прямо подтверждены путем анализа аминокислотной последовательности ферментов, выделенных из бактерий дикого типа, мутантов и ревертантов.

Замены пар оснований, индуцированные мутагенами. Мутации, представляющие собой замену одной пары оснований на другую, можно разделить на два класса: мутации, при которых пурины замещаются на другой пурины (или пиримидины на другой пиримидины), — *транзиции*, и мутации, при ко-

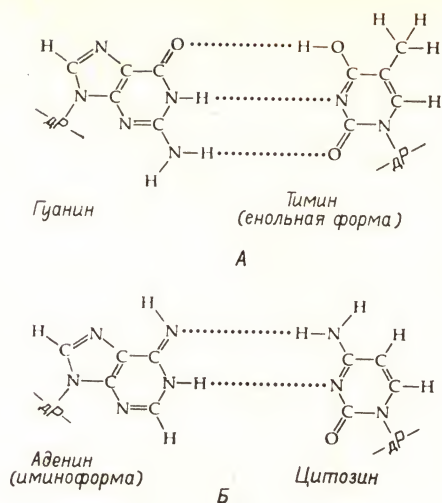


Рис. 13.3. Изменения в образовании пар оснований в результате таутомерных переходов. Тимин в енольной форме (А) образует водородные связи не с аденином, а с гуанином. Аденин в иминоформе (Б) образует водородные связи не с тиминном, а с цитозином. Аналогичные переходы в гуанине и цитозине также вызовут изменения в спаривании оснований. (Сравните структуры, приведенные на этом рисунке, со структурами на рис. 7.41.)

торых пурин замещается на пиримидин или наоборот, — *трансверсии* (рис. 13.2).

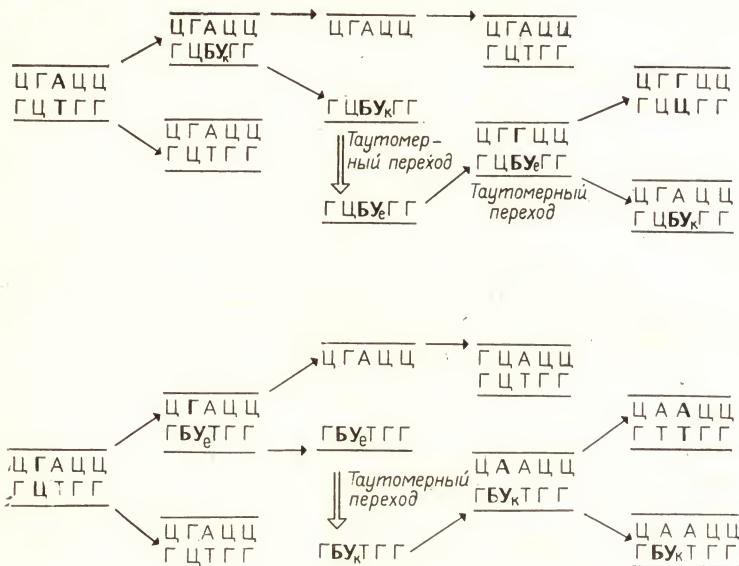
Уотсон и Крик постулировали, что мутации, которые мы теперь называем транзициями, имеют место в тех случаях, когда в каком-либо основании, функционирующем в составе матрицы, происходит *таутомерный* переход. Предполагается, что основания находятся в энергетически наиболее выгодных формах, показанных на рис. 7.41. Переход из кето- в енольную форму, например тимина, или переход аденина из amino- в иминоформу изменяют специфичность образования водородных связей, в результате тимин будет спариваться с гуанином, а аденин с цитозином (рис. 13.3).

Таутомерные переходы такого типа, видимо, обуславливают мутагенную активность аналогов оснований, в частности 5-бромурацила и 2-аминопурина. При добавлении в культуральную среду оба эти соединения легко включаются в синтезируемую ДНК, причем бромурацил замещает тимин, а аминопурин — главным образом аденин. В ходе последующих циклов репликации эти аналоги претерпевают таутомеризацию гораздо чаще, чем обычные основания, и в результате оба соединения вызывают транзиции АТ→ГЦ. Но если одно из этих соединений образует неправильную пару с другим основанием в тот момент, когда оно включается в состав ДНК, происходит транзигия ГЦ→АТ. Пусть, например, бромурацил в момент включения был в енольной форме; тогда он образует пару с гуанином матрицы и заместит цитозин. В ходе следующего цикла репликации, к началу которого бромурацил снова перейдет в наиболее вероятную кетоформу, он вызовет включение в противоположную

Рис. 13.4. А. Если бром-урацил (БУ) включается в состав ДНК в кетоформе (БУ_к), то последующий таутомерный пере-

ход во время репликации вызывает транзицию АТ→ГЦ. Б. Если БУ включается в енольной форме (БУ_е), то по-

следующий таутомерный переход во время репликации вызывает транзицию ГЦ→АТ.



цепь тимина. Таким образом, на месте ГЦ-пары в конце концов появится АТ-пара (рис. 13.4).

Третий мутаген, способный вызывать транзиции в обоих направлениях, — азотистая кислота. Она дезаминирует основания ДНК, в результате чего аминокетопроизводная заменяется гидроксильной группой. Как показано на рис. 13.5, дезаминирование аденина какой-либо АТ-пары превращает его в гипоксантин. При следующем цикле репликации гипоксантин образует пару с цитозином, приводя к транзиции АТ→ГЦ. Азотистая кислота вызывает также транзиции в обратном направлении (ГЦ→АТ) путем дезаминирования цитозина с образованием урацила.

Еще один известный индуктор транзиции — гидроксил-амин. Это соединение реагирует почти исключительно с цитозином. Непосредственный результат реакции — замещение аминокетопроизводной группы оксиаминогруппой. Оксиаминопроизводное цитозина претерпевает частую таутомеризацию, приводя только к транзициям ГЦ→АТ.

Наиболее мощный класс мутагенов — *алкилирующие* агенты, к которым, например, относятся горчиный газ, этилметансульфонат (ЭМС) и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (сокращенно он называется нитрозогуанидином). Структурные формулы этих соединений приведены на рис. 13.6.

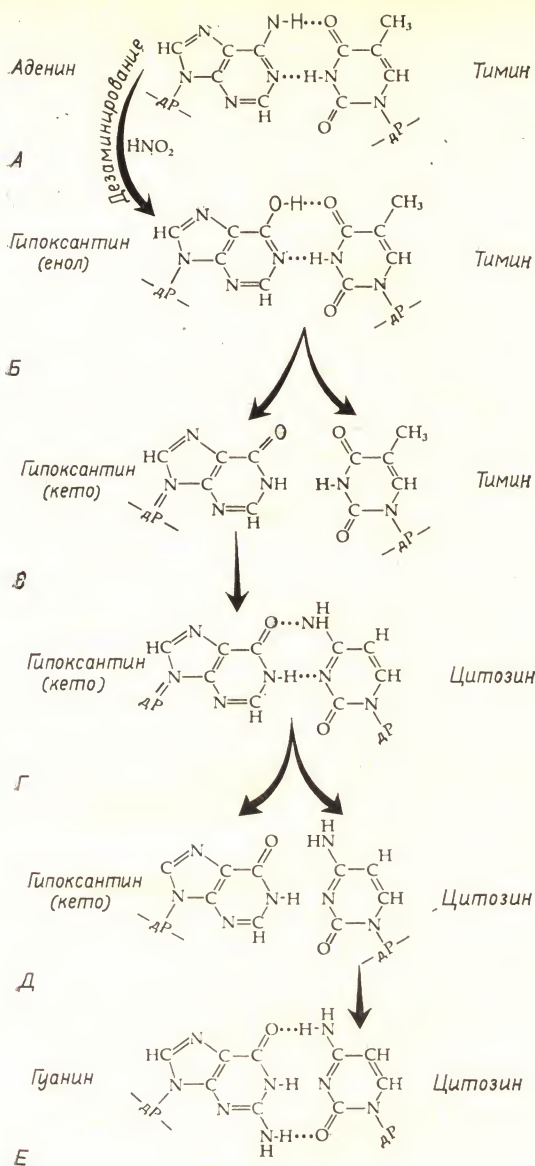
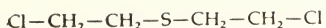
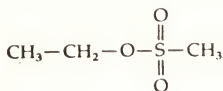


Рис. 13.5. Пример мутации, индуцированной азотистой кислотой. А. АТ-пара оснований ДНК. Б. Дезаминирование аденина с образованием гипоксантина (Гк) дает пару оснований ГкТ. В. При разделении цепей гипоксантин переходит в кетоформу. Г. При репликации образуется пара оснований гипоксантин—цитозин. Д, Е. При следующем цикле репликации на месте, которое раньше занимала АТ-пара, образуется ГЦ-пара.

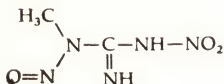


Серный иприт
[ди-(2-хлорэтил)-сульфид]

Рис. 13.6. Структура некоторых алкилирующих агентов.



Этилметансульфонат
(ЭМС)



N-метил-N'-нитро-N-
нитрозогуанидин

Алкилирующие агенты спонтанно переносят алкильную группу на атом азота в кольце основания ДНК; чаще всего наблюдается алкилирование гуанина по азоту в 7-м положении, но иногда происходит также алкилирование по другим атомам.

Алкилирование вызывает ряд изменений в ДНК. Алкилирование гуанина по азоту в 7-м положении приводит к ионизации молекулы, легко изменяющей в свою очередь специфичность спаривания; алкилирование по некоторым другим положениям может полностью блокировать спаривание. Кроме того, алкилирование пуринов ослабляет их связь с дезоксирибозой, вызывая интенсивную апуринизацию ДНК. Все эти изменения, видимо, вносят свой вклад в мутагенное действие алкилирующих агентов, индуцирующих и транзигции, и трансверсии.

Самый сильный известный химический мутаген — нитрозогуанидин; при обработке им клеток *E. coli* в оптимальных условиях индуцируется мутация в каждой выжившей клетке. Обычно возникает ряд тесно сцепленных мутаций в области репликативной вилки ДНК. Специфичность мутагенеза в этой области настолько высока, что добавляя мутаген в строго определенное время в популяцию синхронно реплицирующихся клеток, можно избирательно вызывать мутации в определенных участках хромосомы.

Вставки и делеции, индуцированные мутагенами. Акридиновые красители (наиболее изученным из них является профлавин) индуцируют уникальный класс мутаций. Хотя эти мутации спонтанно ревертируют, а их ревертирование с высокой частотой можно индуцировать акридиновыми красителями, они никогда не ревертируют под действием аналогов оснований, азотистой кислоты или гидроксиламина. Если реверсия все-таки происходит, она обычно оказывается следствием супрессорной мутации, т. е. мутации в другом сайте того же гена, в котором произошла первичная мутация. Кроме того, при отделении супрессорной мутации от первичной с помощью рекомбинации оказывается, что она ведет

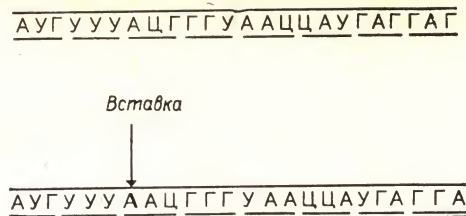


Рис. 13.7. Участок молекулы мРНК. Матрица считывается триплетами (кодонами) слева направо. Вставка А в седьмом положении сдвигает порядок считывания, и все кодоны справа от этой точки изменяются. Измененные кодоны подчеркнуты двумя линиями.

себя в точности так же, как первичная мутация: инактивирует продукт гена и ревертирует только спонтанно или под действием акридиновых красителей. Другими словами, две индуцированные акридином мутации в одном локусе могут подавлять действие друг друга, так что продукт гена остается активным.

Индуцированные акридином мутации обладают еще одним уникальным свойством: они никогда не бывают неполными (leaky), т. е. всегда вызывают полную утрату функции продукта гена. В то же время мутации типа транзиций часто бывают неполными.

Эти особые свойства индуцированных акридином мутаций можно объяснить, если предположить, что акридины вызывают *вставку или делецию одной или нескольких пар оснований ДНК*. Поскольку закодированная в мРНК информация должна считываться триплетами, вставка или делеция вызывает сдвиг порядка считывания, и в результате все кодоны, расположенные после места мутации, изменяются (рис. 13.7).

Очевидно, вставка может быть ревертирована делецией вставленного основания, и наоборот. Однако оказалось, что мутация, вызванная вставкой, может быть ревертирована делецией в другом сайте, расположенном на расстоянии нескольких пар оснований; как показано на рис. 13.8, штамм-ревертант нормален, за исключением группы измененных кодонов между двумя мутационными сайтами. Возможность отбора таких ревертантов показывает, что многие белки остаются функционально активными, хотя протяженные последовательности аминокислот у них изменены.

Индукция вставок и делеций связана со способностью акридинов встраиваться между плоскостями соседних оснований ДНК, как уже говорилось выше. Однако их мутагенность не является просто следствием изменения свойств ДНК-матрицы в момент репликации, так как акридины индуцируют мутации в фагах во время их репликации в бактери-хозяине, но не оказывают никакого мутагенного действия на реплицирующуюся бактериальную ДНК.

Для объяснения этого интересного явления было выдвинуто предположение, что акридины оказывают мутагенное

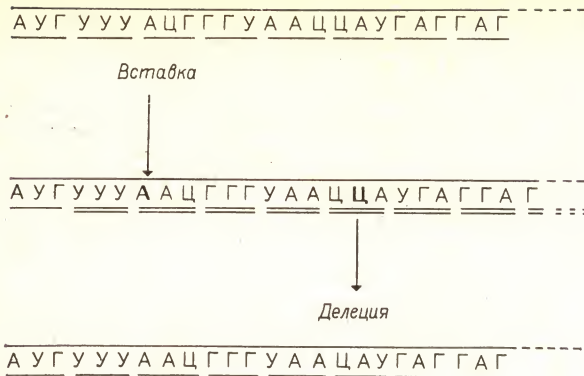


Рис. 13.8. Реверсия оди-
ночной вставки делецией
одного основания. От-
метьте, что ревертант со-
держит ряд измененных
кодонов (подчеркнуты
двумя чертами) между
двумя мутационными
сайтами.

действие только на ДНК, претерпевающую *рекомбинацию*, — известно, что фаговая ДНК во время репликации часто рекомбинирует, тогда как для бактериальной ДНК это не характерно. Данное предположение подтверждается опытами с частичными диплоидами *E. coli*. Частично диплоидные зиготы образуются при конъюгации бактерии в результате неполного переноса хромосомы из одной бактериальной клетки в другую. Если зиготы *E. coli* обработать акридином, мутации со сдвигом рамки индуцируются в диплоидной, но не в гаплоидной области хромосомы.

На раннем этапе процесса рекомбинации в двухцепочечных молекулах ДНК образуются одноститые разрывы (см. гл. 15). Этот факт, а также данные о том, что акридины чаще действуют на участки ДНК с одинаковыми короткими последовательностями пар оснований, позволили выдвинуть гипотезу о механизме мутагенеза, которая иллюстрируется рис. 13.9. Предполагается, что акридины стабилизируют неправильное спаривание цепей, которое происходит при образовании одноститых разрывов вблизи повторяющихся последовательностей.

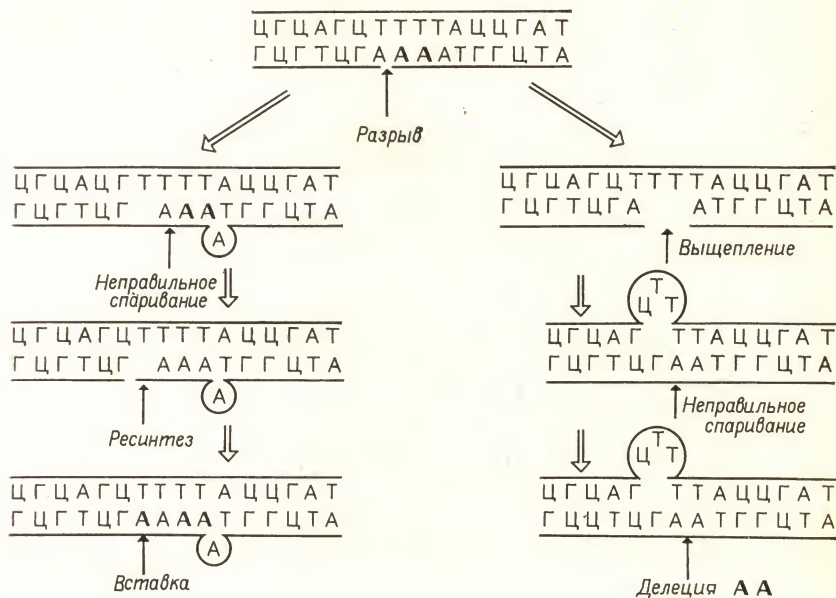
Мутации, индуцируемые ультрафиолетовым светом. ДНК сильно поглощает ультрафиолетовый свет; максимум поглощения ДНК приходится на длину волны 260 нм. При облучении УФ-светом клетки быстро гибнут, а у выживших наблюдается высокий уровень мутирования.

При облучении растворов ДНК ультрафиолетовым светом в молекуле происходят химические изменения двух типов. Во-первых, образуются ковалентные связи между пиримидиновыми остатками, расположенными рядом друг с другом в одной цепи ДНК. Образующиеся *пиримидиновые димеры* нарушают вторичную структуру ДНК и спаривание оснований. Во-вторых, происходит гидратация пиримидиновых остатков по 4,5-двойной связи.

Рис. 13.9. Возможный механизм мутаций со сдвигом рамки. В последовательности из нескольких АТ-пар основания возникает одноните-

вой разрыв. Слева показано неправильное спаривание, которое после синтеза участка ДНК и сшивания цепи приводит к вставке А в одну из

цепей. Справа показано, как удаление двух нуклеотидов, последующее неправильное спаривание и сшивание цепи приводит к делеции двух А в одной из цепей.



Установлено, что мутагенное действие ультрафиолетового света обусловлено в основном образованием пиримидиновых димеров. Это доказывается тем, что при удалении или расщеплении димеров мутагенное действие УФ-света большей частью снимается. Например, если облученные УФ-светом клетки некоторых бактерий немедленно облучить видимым светом с длиной волны 300—400 нм, то и летальность, и частота мутирования сильно снижаются; это явление называется *фотореактивацией* (рис. 13.10). Было показано, что она обусловлена световой активацией фермента, расщепляющего пиримидиновые димеры.

Все клетки обладают также набором разнообразных ферментов, осуществляющих «темновую репарацию» ДНК, поврежденной ультрафиолетовым светом. Процесс репарации включается, видимо, благодаря нарушению структуры двойной спирали вблизи димера и протекает в несколько этапов. Вначале специфическая эндонуклеаза делает разрез в сахарофосфатном остоле молекулы рядом с димером и таким образом инициирует вырезание димера. На втором этапе экзонуклеаза расширяет пробел, постепенно деградируя разре-

Рис. 13.10. Фотореактивация. Поверхность чашки с агаром была равномерно засеяна большим числом клеток *E. coli* и облучена УФ-светом, доза которого достаточна для уничтожения почти всех клеток. Затем часть чашки облучили в течение короткого вре-

мени видимым светом, сфокусировав на ее поверхности изображение вольфрамовой нити лампы. Чашку инкубировали в темноте до завершения роста бактерий. На большей части чашки образовали колонии лишь несколько выживших после УФ-облучения кле-

ток. Но в том месте, которое было освещено видимым светом, выросло большое количество колоний. Они повторяют рисунок вольфрамовой нити лампы, используемой как источник света при фотореактивации. [Kelner A., Ultraviolet irradiated *E. coli*, J. Bacteriol., 58, 512 (1949).]



занную цепь начиная с 3'-конца¹. На третьем этапе ДНК-полимераза *восстанавливает отсутствующий участок*, используя в качестве матрицы сохранившуюся противоположную цепь. На четвертом этапе полинуклеотидлигаза сшивает концы цепи (рис. 13.11)².

Условия выращивания культуры после облучения, способствующие описанным процессам репарации и подавляющие репликацию ДНК, вызывают утрату множества потенциальных мутаций, индуцированных ультрафиолетовым светом. Наоборот, условия, способствующие репликации, но подавляющие репарацию, увеличивают число мутаций в облу-

¹ Эндонуклеазы — ферменты, катализирующие гидролиз фосфодиэфирных связей полинуклеотидной цепи. Экзонуклеазы — ферменты, гидролизующие концевую фосфодиэфирную связь полинуклеотидной цепи и отщепляющие концевой нуклеотид. Под действием экзонуклеазы происходит постепенная деградация цепи.

² На рис. 13.11 изображена только одна из ветвей эксцизионного механизма репарации ДНК: возникновение длинных пробелов, которые затем заполняются с помощью ДНК-полимеразы III. В другой ветви эксцизионной репарации после появления эндонуклеазного разрыва димер выплывается в составе короткого олигонуклеотида под действием 5'→3' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I, которая осуществляет одновременно и репаративный синтез в образующихся коротких пробелах. — *Прим. ред.*

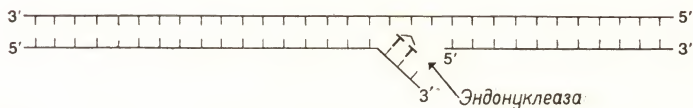
Рис. 13.11. Репарация ДНК, поврежденной ультрафиолетовым облучением. А. В результате облучения образовался тиминный димер. Б. Специфическая эндо-

нуклеаза вызывает разрыв около димера. В. Свободный 3'-конец атакуется экзонуклеазой, которая обеспечивает вырезание димера и расширение пробела. Г.

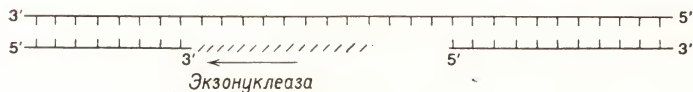
ДНК-полимераза восстанавливает недостающий участок. Д. Полинуклеотидлигаза сшивает цепь, соединяя 3' и 5'-концы.



А



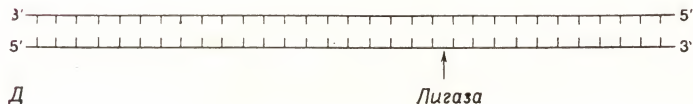
Б



В



Д



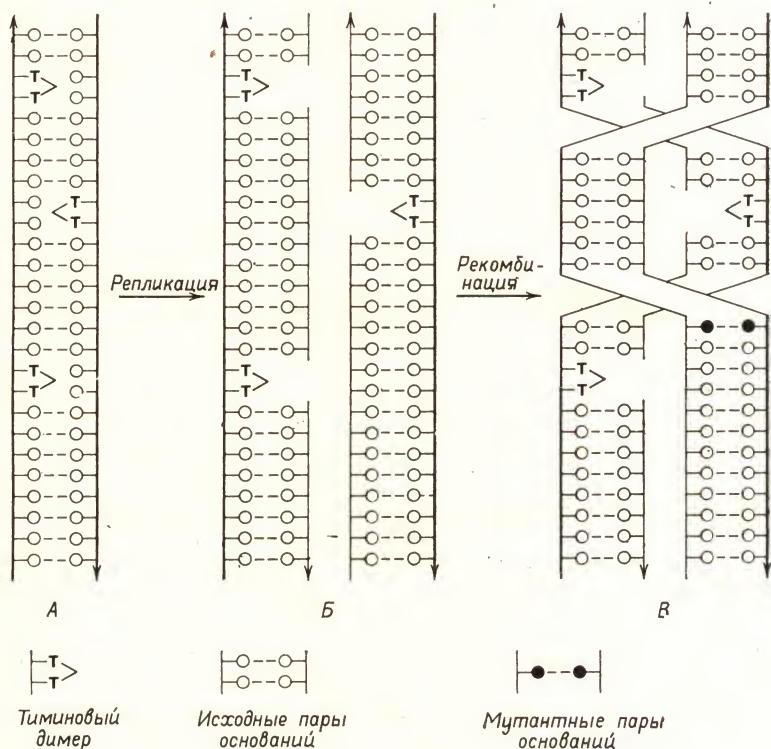
ченных клетках. Следовательно, частота мутаций, вызванных образованием димеров, зависит от исхода «соревнования» между ферментативными системами репликации и репарации. Если первыми достигают димера ферменты репликации, происходит мутация, если же ферменты репарации, то димер вырезается и мутация не возникает.

Репликация ДНК, содержащей пиримидиновые димеры, приводит к замещениям пар оснований в дочерних дуплексах. Механизм этого процесса сложен, он изображен на рис. 13.12. В начале полуконсервативной репликации образуются два дочерних дуплекса с пробелами в цепи напротив пиримидино-

Рис. 13.12. Мутация, индуцированная УФ-светом. А. Облучение вызывает образование в ДНК пиримидиновых димеров, расположенных в молекуле случайным об-

разом. Б. При репликации образуются два функционально неактивных дуплекса с пробелами в тех местах, где были димеры. В. Рекомбинация между сестрин-

скими дуплексами восстанавливает исходную структуру. В результате ошибок при рекомбинации происходят замены пар оснований (мутации).



вых димеров. Эти дуплексы функционально неактивны, но рекомбинация между сестринскими хроматидами может восстановить совершенно нормальный дуплекс из двух поврежденных¹. Замещения пар оснований, индуцированные ультрафиолетовым светом, происходят, по-видимому, в результате возникновения ошибок во время репаративного синтеза, представляющего собой один из этапов пострепликативной репарации. Известны мутанты *E. coli*, у которых изменен путь мутагенной репарации, и мутагенное действие УФ-света на них выражено очень слабо.

¹ Такой механизм получил название пострепликативной рекомбинационной репарации. Имеется также другой, индуцибельный и нерекомбинационный механизм пострепликативной репарации, играющий основную роль в фиксации мутаций. — Прим. ред.

Мутации, вызванные включением профага. Как уже говорилось в гл. 12, большинство фагов включается в бактериальную хромосому в специфических участках, которые, насколько известно, не несут никакой иной функции. Однако один фаг — так называемый μ -фаг — обладает замечательным свойством встраиваться в бактериальную хромосому совершенно случайным образом внутрь действующих генов. Такая вставка вносит существенное изменение в последовательность оснований бактериального гена, и обычный продукт гена (например, фермент) не образуется. Поэтому каждая лизогенизированная клетка является индуцированным мутантом по тому или иному гену; соответствующий отбор после лизогенизации фагом μ позволяет выделить ауксотрофные и другие мутанты, характеризующиеся утратой обязательной функции.

Спонтанные мутации. Термин *спонтанные* относится к тем мутациям, которые происходят в отсутствие явного мутагенного воздействия. Скорость спонтанного мутирования непостоянна, она зависит от условий окружающей среды. Например, в клетках *E. coli*, растущих в хемостате с очень низкой скоростью, скорость спонтанного мутирования зависит от наличия питательного вещества, ограничивающего скорость роста, и может сильно варьировать. Скорость мутирования в клетках, растущих анаэробно, ниже, чем в клетках, растущих аэробно.

Механизмы спонтанного мутирования весьма разнообразны. Было показано, что некоторые продукты и интермедиаты клеточного метаболизма мутагенны; к ним относятся перекиси, азотистая кислота, формальдегид и аналоги пуринов. Таким образом, ряд спонтанных мутаций в действительности индуцируется эндогенными мутагенами. Эти соединения индуцируют мутации различных типов — транзиции, трансверсии и, возможно, вставки и делеции. Исследования по реверсии спонтанных мутаций показали, что среди них встречаются все эти разновидности мутаций.

Мутация в одном из генов *E. coli* и в сходном гене *Salmonella typhimurium* вызывает, как было показано, увеличение скорости спонтанного мутирования всех локусов в 100—1000 раз. Мутации, возникшие в присутствии нового аллеля мутаторного локуса, являются трансверсиями. Продукт бактериального гена-мутатора не известен, но у колифага T4 обнаружен сходный ген-мутатор, и продуктом этого гена оказалась ДНК-полимераза. Это открытие влечет за собой весьма важные последствия, так как оно показывает, что выбор нуклеотидов для синтеза новой цепи ДНК зависит не только от определяемой матрицей специфичности спаривания, но и от точности работы ДНК-полимеразы. Поскольку измененная в результате мутации полимеразы дает очень высокую частоту неправильного спаривания, приводящего к трансвер-

сиям, есть все основания полагать, что и при работе полимеразы фагов и бактерий дикого типа также могут спонтанно образовываться неправильные пары, хотя и с гораздо меньшей частотой.

Наконец, было доказано, что небольшая часть спонтанных мутаций вызвана *делециями* участков ДНК. Их протяженность варьирует от значительной части одного гена до нескольких генов. Например, при отборе устойчивых к фагу T1 мутантов *E. coli* (штамм В) оказывается, что небольшая часть устойчивых мутантов нуждается для своего роста в триптофане. Эксперименты по генетическому картированию показали, что гены рецептора фага T1 и ферментов биосинтеза триптофана расположены рядом друг с другом и в таких *плейотропных* мутантах обе области утрачены в результате спонтанной делеции. Ни один из известных мутагенов не может индуцировать таких больших делеций; они всегда спонтанны.

Имея в виду перечисленные механизмы возникновения спонтанных мутаций, мы можем теперь представить себе два основных способа воздействия окружающей среды на скорость спонтанного мутирования. Во-первых, следует ожидать, что условия окружающей среды в значительной степени влияют на скорость образования эндогенных мутагенов. Во-вторых, многие из описанных механизмов предполагают участие ферментов (ДНК-полимеразы, ферментов рекомбинации и репарации), а окружающая среда может влиять на синтез и работу этих ферментов.

ДЕЙСТВИЕ МУТАЦИЙ НА ПРОЦЕСС ТРАНСЛЯЦИИ

БЕССМЫСЛЕННЫЕ МУТАЦИИ

Считается, что кодон имеет «смысл», если он правильно транслируется, т. е. обеспечивается включение в полипептид аминокислоты, кодируемой данным кодоном. Мутантный кодон, который транслируется в другую (неправильную) аминокислоту, вносит *ошибку* в мРНК, и мутация, в результате которой появляется такой кодон, называется *миссенс-мутацией*.

Как показано, три мутантных кодона (УАГ, УАА и УГА) вызывают *преждевременную терминацию* синтеза полипептида: когда рибосома достигает такого кодона, процесс элонгации полипептидной цепи заканчивается и высвобождается неполный полипептид. Такие кодоны называются *бессмысленными* или *нонсенс-кодонами*, а мутации, в результате которых они образуются, — *нонсенс-мутациями*.

Поскольку природа и функция нонсенс-мутаций в момент их открытия была неизвестна, им дали общепринятые тривиальные названия *амбер-мутации* (в результате которой, как теперь известно, возникает кодон УАГ) и *охра-мутации*

(вызывающей появление кодона УАА). Соответствующие кодоны обычно называют *амбер-кодоном* (УАГ) и *охра-кодоном* (УАА). Аналогичное название для кодона УГА не получило распространения.

Когда стало ясно, что нонсенс-кодоны вызывают преждевременную терминацию синтеза полипептидной цепи, возникло предположение, что данное явление связано с отсутствием соответствующих разновидностей тРНК. Эта гипотеза была подтверждена исследованиями связывания молекул тРНК с рибосомами в присутствии синтетических нуклеотидных триплетов: из 64 возможных триплетов только УАГ, УАА и УГА не стимулировали связывания никаких тРНК.

Взглянув на табл. 7.8, легко заметить, что существует множество вариантов замен одной пары оснований, превращающих «осмысленный» кодон в нонсенс-кодон: например, УГГ, кодирующий триптофан, превращается в бессмысленный кодон (УГА) при транзиции последней буквы.

Итак, существуют три кодона, способные осуществлять терминацию синтеза цепи; весьма вероятно, что какие-то из них являются *естественными терминаторами синтеза цепи* при трансляции. Как мы увидим далее, некоторые группы генов транскрибируются в единую *полигенную информационную* РНК; когда рибосома движется вдоль полигенной матрицы, она должна получать сигналы об окончании одной полипептидной цепи и начале следующей. Сигналом терминации, возможно, является один из бессмысленных кодонов.

СУПРЕССОРНЫЕ МУТАЦИИ

Активность белка, утраченная в результате мутации, может быть по крайней мере частично восстановлена под действием второй мутации в другом сайте. Мутации этого типа называются *супрессорными мутациями*, а гены, в которых они возникают, — *супрессорными генами*. Термин «супрессор» обычно относится к мутантному аллелю супрессорного гена.

Супрессорные мутации могут возникать в том же гене, что и первичная мутация (*внутригенные супрессоры*) или в других генах (*внегенные супрессоры*). Внутригенные супрессоры бывают двух типов: одни вызывают замену аминокислоты, устраняющую действие первичной миссенс-мутации и восстанавливающую до некоторой степени активность белка; другие — вставки или делеции, компенсирующие первичную мутацию со сдвигом рамки.

Все внегенные супрессоры, изученные до настоящего времени, оказались мутациями в генах, кодирующих тРНК (рис. 13.13). Рассмотрим следующий пример. Первичная мутация *E. coli* превратила нормальный (осмысленный) кодон в нонсенс-кодон УАГ. Был выделен ревертант этого мутанта и показано, что он несет исходную нонсенс-мутацию вместе с внегенным супрессором. Последний, как выяснилось, пред-

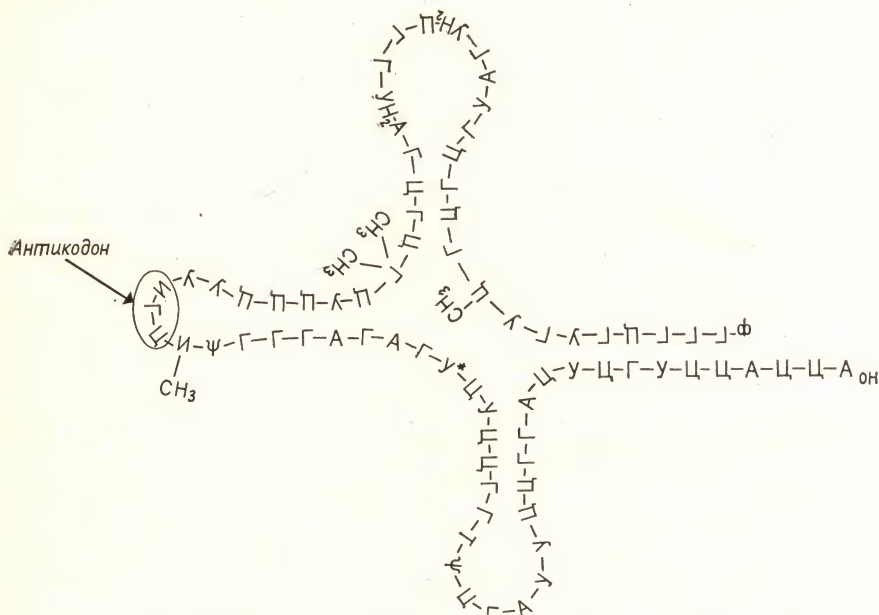
Рис. 13.13. Схематическое изображение аланиновой тРНК в одной из возможных конформаций. Показаны 4 участка, где комплементарные основания образуют водородные связи. Антикодон, ЦГИ, комплементарен кодону, ГЦЦ (И образует пару с таким же основанием, как

и Г). Обозначения: ф — фосфат; А — аденозин-3'-фосфат; Ц — цитидин-3'-фосфат; Аон — аденозин; УН₂ — 5,6-дигидроуридин-3'-фосфат;

$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{Г} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ — N²-диметил-

гуанозин-3'-фосфат; И — инозин-3'-фосфат; Г —

CH₃ — 1-метилгуанозин-3'-фосфат; И — CH₃ — 1-метилюридин-3'-фосфат; ψ — псевдоуридин-3'-фосфат; Т — риботимидин-3'-фосфат; У* — смесь У и УН₂. [Holley R. W. et al., Structure of a ribonucleic acid, Science, 147, 1462 (1965).]



ставляет собой мутацию в гене, кодирующем *сериновую тРНК*, поэтому ревертант синтезирует измененную тРНК с кодоном, узнающим УАГ. Таким образом, ревертант образует нормальный полипептид с серином в том положении, где у первичного нонсенс-мутанта был участок преждевременной терминации цепи¹.

В предыдущем разделе настоящей главы мы отмечали, что большинство супрессоров *мутаций со сдвигом рамки* представляет собой компенсаторные вставки или делеции в том же гене. Однако некоторые супрессоры мутаций со сдвигом рамки являются *внегенными*; они оказались мутациями в генах, кодирующих тРНК. Таким образом, порядок считывания, измененный в результате вставки одного основания,

¹ Благодаря тому что клетка обладает несколькими тРНК для каждой аминокислоты и остальные сериновые тРНК продолжают нормально функционировать, ревертант все-таки сохраняет способность включать серин в те места полипептида, где он расположен в норме.

может быть восстановлен мутацией, изменяющей антикодон тРНК и позволяющей ей узнавать последовательность четырех оснований в мРНК вместо трех.

Поскольку для связывания тРНК с кодоном в мРНК необходима рибосома, изменения в рибосоме также могут влиять на процесс узнавания. Измененная рибосома может время от времени давать мутантному кодону возможность связываться с необычной тРНК и, таким образом, обеспечивать супрессию. Было обнаружено, что стрептомицин и сходные с ним по структуре антибиотики связываются с рибосомами некоторых устойчивых к стрептомицину мутантов и изменяют считывание генетического кода в системе *in vitro*. Синтетическая матрица, например полиуридиновая кислота, в норме обуславливает включение в полипептид только фенилаланина, так как содержит только кодоны УУУ. Однако в присутствии стрептомицина происходит также включение изолейцина (кодон АУУ), серина (кодон УЦУ) и других аминокислот. Такое действие стрептомицина может приводить к супрессии мутаций *in vivo*. Некоторые ауксотрофные мутанты могут расти в присутствии необходимого фактора роста или стрептомицина; было обнаружено, что клетки, растущие в присутствии стрептомицина, синтезируют небольшое количество нормального фермента, который был утрачен в результате мутации.

Чтобы клетка могла выжить, супрессия с помощью одного из описанных выше механизмов должна быть крайне неэффективной. Любой из механизмов супрессии изменит считывание супрессируемого кодона, где бы он ни находился в ДНК клетки, а каждый кодон встречается почти в любом гене несколько раз. Поэтому в том случае, если супрессия слишком эффективна, она приведет к инактивации всех белков клетки. Если же супрессия происходит с низкой частотой, все белки клетки в большинстве случаев будут синтезироваться правильно. Например, если эффективность супрессии равна 5%, то в 5% случаев мутантный фермент будет синтезироваться в активной форме, тогда как остальные белки будут синтезироваться правильно в 95% случаев. Для многих ферментов уровень активности, равный 5% активности в клетках дикого типа, достаточен для роста клетки. В действительности обычно супрессия восстанавливает активность поврежденного фермента до уровня, равного 10% и менее от активности у исходного дикого типа.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛЯЦИИ

ИНДУКЦИЯ И РЕПРЕССИЯ СИНТЕЗА ФЕРМЕНТОВ

Физиологические аспекты регуляции синтеза ферментов обсуждались в гл. 8. Напомним, что низкомолекулярные субстраты и клеточные метаболиты могут влиять на скорость син-

теза ферментов двояким образом. Некоторые из них действуют как *индукторы*, вызывая заметное увеличение скорости синтеза одного или нескольких специфических ферментов; этот тип физиологического контроля особенно распространен в регуляции катаболических реакций. Другие действуют как *репрессоры*, заметно снижая скорость синтеза одного или нескольких специфических ферментов; этот тип контроля характерен для биосинтетических путей, причем конечные продукты этих путей репрессируют синтез специфических ферментов, участвующих в их образовании.

Наши знания о регуляции синтеза ферментов на физиологическом и генетическом уровне получены главным образом в результате изучения β -галактозидазной системы *E. coli*, проведенного Ж. Моно (J. Monod), Ф. Жакобом (F. Jacob) и их сотрудниками. Эта группа ученых выдвинула общую гипотезу, объясняющую регуляцию действия гена на генетическом уровне.

Первые сведения о механизме этой регуляции были получены благодаря обнаружению мутантов *E. coli*, у которых синтез β -галактозидазы стал конститутивным. Генетические эксперименты показали, что многие мутации, приводящие к конститутивности синтеза β -галактозидазы, картируются в одном локусе. Этот локус был назван *локусом i* от слова «индуцибельность» (inducibility); в настоящее время принято обозначать этот локус *lac I* как один из локусов, имеющих отношение к использованию лактозы.

Продукт аллеля дикого типа локуса *lac I* (*lac I*⁺) детерминирует индуцибельное состояние, продукт мутантного аллеля (*lac I*⁻) — конститутивное. Чтобы выяснить, какой из двух аллелей является доминантным, измеряли количество β -галактозидазы в *частичных диплоидах E. coli*, образующихся как временные зиготы при конъюгации¹.

Диплоидные и гетерозиготные по локусу *lac I* зиготы оказались индуцибельными; следовательно, *lac I*⁺ доминирует над *lac I*⁻. Очевидно, доминантный аллель *lac I*⁺ детерминирует генный продукт, активно подавляющий образование β -галактозидазы; этот продукт был назван *репрессором*.

Открытие *lac*-репрессора привело к созданию общей концепции, состоящей в том, что индуцибельные ферменты — это те ферменты, для которых клетка постоянно синтезирует репрессоры; *роль индуктора состоит в связывании с репрессором и его инактивации*. Данная теория была обобщена для объяснения репрессии конечным продуктом введением предположения, что существуют гены, детерминирующие репрессоры для биосинтетических ферментов. Репрессор этого типа должен быть неактивен в качестве ингибитора синтеза фер-

фермента до тех пор, пока он не активируется путем связывания с конечным продуктом биосинтетического пути.

Адекватность общей теории репрессии была вскоре подтверждена благодаря открытию генов, мутации в которых вызывают *дерепрессию* образования биосинтетических ферментов даже в присутствии избытка конечных продуктов. Гены, продуцирующие репрессоры, были названы *регуляторными генами* и часто обозначаются буквой R. Таким образом, регуляторный ген ферментов биосинтеза аргинина обозначается *arg R*, ферментов биосинтеза триптофана — *trp R* и т. д.

Общая теория генетической репрессии была проверена в опытах на диплоидных и гетерозиготных по регуляторным локусам клетках. Так, диплоид *arg R⁺/arg R⁻* репрессирован в отношении синтеза ферментов биосинтеза аргинина, поскольку аллель *arg R⁺* в диплоиде продолжает синтезировать репрессор, активируемый аргинином. К настоящему времени идентифицированы регуляторные локусы для многих катаболических и биосинтетических систем.

Химическая природа репрессоров в течение некоторого времени оставалась неизвестной. Однако после открытия мутаций регуляторных генов, которые могут супрессироваться внегенными супрессорами, стало ясно, что репрессоры являются белками, так как супрессия действует только на уровне трансляции. Действительно, репрессорный белок, детерминированный локусом *lac I*, был выделен и идентифицирован благодаря своей способности связывать специфические индукторы. Механизм, с помощью которого репрессоры — белковые молекулы — ингибируют образование фермента, будет обсуждаться в следующем разделе.

ОПЕРАТОРНЫЕ ГЕНЫ

Существование репрессора предполагает наличие в клетке мишени, на которую он действует; должен быть *рецепторный участок*, связывающий репрессор для исключения синтеза определенного фермента.

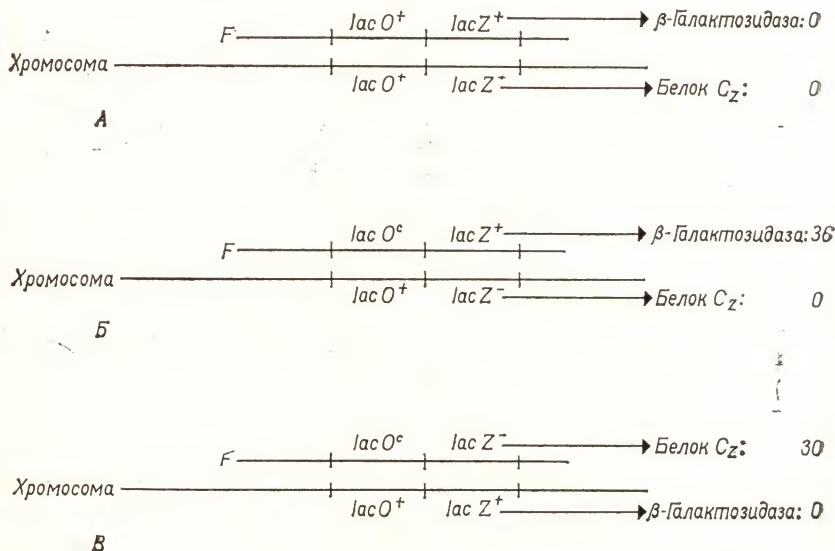
Исходя из общих представлений о механизме синтеза белка, можно сказать, что таких потенциальных мест по меньшей мере два: репрессор может связываться или с участком ДНК, блокируя транскрипцию определенного гена, или с участком информационной РНК, блокируя трансляцию определенной молекулы мРНК. Эксперименты с очищенным репрессором и ДНК, содержащей лактозные гены¹, показали, что репрессор *lac I* связывается с ДНК. Точно так же было показано, что репрессор триптофановых (*trp*), арабинозных (*ara*) и аргини-

¹ Такая ДНК может быть выделена из некоторых трансдуцирующих фагов, специфически включающих фрагмент бактериальной хромосомы с *lac*-генами (гл. 15).

Рис. 13.14. Тест на выявление гена-оператора. А. В диплоиде, содержащем два аллеля *lac O* дикого типа, ни β -галактозидаза, ни белок C_z в неиндуцированных клетках не образуются. Б.

Если *lac Z*⁺ находится рядом с аллелем *lac O*^c, β -галактозидаза синтезируется конститутивно. В. Если *lac Z*⁻ примыкает к аллелю *lac O*^c, белок C_z образуется конститутивно. Продукт

гена, примыкающего к *lac O*⁺, в неиндуцированных клетках не обнаруживается. F—F-фактор; числа обозначают количество продукта гена в условных единицах.



новых (*arg*) генов, а также белок, активируемый катаболизмом (БАК) и рассмотренный в гл. 8, связываются с ДНК.

Участок ДНК, представляющий собой место связывания репрессора, называется *операторным локусом*. При регуляции синтеза β -галактозидазы репрессор связывается с самим операторным локусом. Этот локус (*lac O*) может быть идентифицирован благодаря своей способности мутировать, переходить в другую форму (*lac O*^c), которая не может связываться с репрессором; эта мутация делает синтез фермента конститутивным.

«Оператор-конститутивный» мутант обычно можно отличить от «регулятор-конститутивного» мутанта типа *lac I*⁻ в опытах с использованием частичных диплоидов. В то время как диплоид *lac I*⁺/*lac I*⁻ индуцибелен, потому что образует репрессор, кодируемый *lac I*⁺, диплоид *lac O*⁺/*lac O*^c¹) конститутивен, поскольку β -галактозидазный ген, расположенный рядом с аллелем *lac O*^c, продолжает работать, несмотря на присутствие репрессора в клетке и способность его связы-

¹ Диплоиды по гену *lac O* были получены с помощью эписом F-*lac*, описанных в гл. 15 (*lac O* — аллель дикого типа, *lac O*^c — конститутивный аллель).

ваться с аллелем *lac O*⁺ на другой хромосоме диплоида. Для подтверждения того, что операторный локус контролирует работу только соседних генов в той же хромосоме, были получены диплоиды, конститутивные по операторному локусу и гетерозиготные по β-галактозидазному локусу. Этот последний локус был обозначен *lac Z* и присутствовал в диплоидах в двух формах: *lac Z*⁺, детерминирующей нормальную β-галактозидазу, и *lac Z*⁻, детерминирующей неактивную форму β-галактозидазы, которую можно выявить иммунологически. Для диплоидов, схематически показанных на рис. 13,14, определили количество β-галактозидазы и неактивного белка (*C_Z*) в индуцированных и неиндуцированных клетках. Полученные результаты полностью подтвердили правильность предположенной гипотезы: аллель *lac Z*, соседствующий с *lac O*⁺, был всегда индуцибельным, тогда как аллель *lac Z*, соседствующий с *lac O*^c, — всегда конститутивным, хотя оба аллеля *lac O* присутствовали в одной клетке. Этот результат позволил отвергнуть возможность образования диффундирующего продукта гена-оператора, способного влиять на выражение аллеля *lac Z* в другой хромосоме.

ОПЕРОНЫ

На раннем этапе изучения генетической регуляции метаболизма β-галактозидов было открыто, что некоторые мутанты, не способные сбраживать лактозу, содержат нормальное количество β-галактозидазы, но лишены специфической пермеазы. Эта пермеаза активно переносит β-галактозиды внутрь клетки; мутанты, лишенные пермеазы, могут расти на лактозе только в том случае, если лактозу добавляют в среду в очень высокой концентрации.

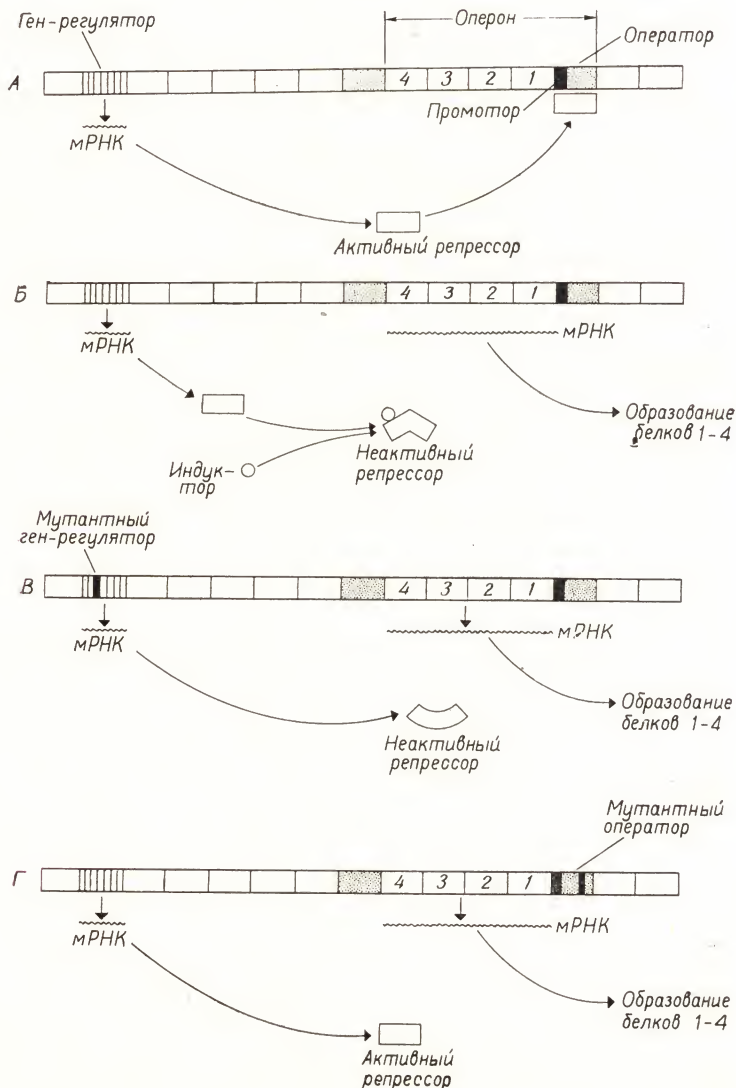
Оказалось, что все мутации, нарушающие синтез β-галактозидпермеазы, картируются в одном локусе, обозначенном через *Y* (*lac Y*). Некоторые мутации затрагивают третий локус, *lac A*, обеспечивающий синтез трансацетилазы β-галактозидов. Эксперименты по картированию показали, что гены *lac O-lac Z-lac Y-lac A* тесно сцеплены и образуют указанную последовательность. Из опытов по выяснению функции генов *lac I* и *lac O* следовало, что синтез β-галактозидазы, пермеазы и трансацетилазы всегда изменяется одинаковым образом: все эти ферменты индуцибельны в клетках *lac I*⁺ и конститутивны в *lac I*⁻; все они индуцибельны, если соответствующие гены примыкают к гену *lac O*⁺, и все конститутивны, если гены примыкают к *lac O*^c, даже в диплоидных клетках.

Итак, гены *lac Z*, *lac Y* и *lac A* ведут себя как единица координированного выражения, и такая единица — вместе с оператором — называется опероном. В настоящее время известны многие другие опероны, контролирующие как катаболические, так и биосинтетические пути.

Рис. 13.15. Регуляция оперона. Горизонтальная полоса изображает участок хромосомы, каждый сегмент изображает ген. А. Активный репрессор, продуцируемый регуляторным геном, связывается со специфическим оператором и блокирует транскрипцию четырех прилегающих генов. Б. Молекула

индуктора соединяется с репрессором и инактивирует его, предотвращая его связывание с оператором; оперон транскрибируется. (Эта ситуация типична для оперона, кодирующего ферменты катаболического пути; в случае биосинтетических путей репрессор сам по себе неактивен; активируется

он лишь после соединения с корепрессором, например конечным продуктом пути.) В. В результате мутации в регуляторном гене образуется неактивный репрессор, оперон действует конститутивно. Г. Мутация в операторе препятствует связыванию активного репрессора, оперон действует конститутивно.



Поскольку репрессоры — свободно диффундирующие молекулы, регуляторный локус в отличие от операторного не обязательно должен лежать в непосредственной близости от генов, которые он регулирует, и многие регуляторные локусы действительно расположены на хромосоме на некотором расстоянии от соответствующих оперонов.

Оперон представляет собой исключительно эффективный механизм регуляции путей метаболизма. Ферменты метаболического пути должны работать как единое целое: если путь функционирует, все участвующие в нем ферменты должны работать с примерно одинаковой скоростью, если же нет — ни один из участвующих в нем ферментов не нужен для проявления клеточной активности. Сгруппированность генов, ответственных за синтез ферментов одного пути, обеспечивает их координированную регуляцию.

Оставалось лишь выяснить, каким образом оператор, связанный с молекулой репрессора, может обеспечивать подавление транскрипции ряда соседних генов. Ответ на этот вопрос был получен, когда удалось показать, что все гены оперона транскрибируются в виде единой очень длинной молекулы *полигенной информационной РНК*. Фермент транскрипции — РНК-полимераза — связывается с участком ДНК, который называется *промотором*, и транскрибирует последовательно все гены оперона. Когда молекула репрессора связывается с оператором, расположенным в непосредственной близости от промотора, она стерически препятствует инициации процесса транскрипции. Этот механизм схематически изображен на рис. 13.15¹. В *lac*-опероне последовательность генов следующая: промотор-*lacO-lacZ-lacY-lacA*.

ТРАНСЛЯЦИЯ ПОЛИГЕННОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ РНК: ПОЛЯРНОСТЬ

Транскрипция целого оперона с образованием единой молекулы мРНК объясняет не только способность связанного с оператором репрессора подавлять выражение всех генов оперона одновременно, но также и тот факт, что нонсенс-мутации оказывают полярное действие на трансляцию. *Полярность*, проявляемая нонсенс-мутациями, характеризуется сильным снижением синтеза ферментов, кодируемых всеми генами, лежащими дистально по отношению к мутации (т. е. расположенными по другую сторону от мутации, чем оператор).

Чтобы объяснить происхождение эффекта полярности, рассмотрим гипотетический оперон, содержащий пять генов: оператор-А-В-С-Д. Нонсенс-мутация в гене А приведет к полному исчезновению фермента А и снижению количества

ферментов В, С и D; нонсенс-мутация в гене В приведет к полному исчезновению фермента В и снижению количества ферментов С и D, синтез же фермента А останется прежним. В некоторых случаях полярность абсолютна, и гены, дистальные по отношению к нонсенс-мутации, не действуют.

Причину возникновения полярности можно объяснить следующим образом. Трансляция полигенной матрицы должна начинаться на том конце, где расположен оператор; это — единственное место, к которому может прикрепляться рибосома. Прикрепившись к матрице, рибосома транслирует по очередности каждый ген, высвобождая отдельные полипептиды по достижении кодона терминации синтеза цепи. Но если в результате нонсенс-мутации терминирующий синтез цепи кодон появляется в середине гена, рибосома высвобождает неполный полипептид, отделяясь с высокой вероятностью от матрицы до того, как достигает кодона, обозначающего начало следующего гена. Информационная РНК теперь не защищена в этом месте рибосомой и чувствительна к нуклеазам.

Рибосомы, которые остаются прикрепленными к матрице, способны снова начать трансляцию в начале следующего гена полигенной матрицы, если матрица не деградировала. Чем ближе расположена нонсенс-матрица к концу гена, тем выше вероятность того, что реинициация трансляции опередит деградацию. Таким образом, полярность выражена более сильно, если нонсенс-мутация локализована на проксимальном конце гена (ближе к оператору).

РАЗНООБРАЗИЕ МЕХАНИЗМОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Выше мы описали лишь один из механизмов генетической регуляции — тот, который действует в случае *lac*-генов и их продуктов. Напомним основные свойства этой системы. Ряд функционально связанных генов, расположенных последовательно в хромосоме, примыкает к особому участку, называемому *оператором*. *Ген-регулятор* детерминирует продукт — *lac*-репрессор, который связывается с оператором и предотвращает инициацию транскрипции *lac*-генов. *lac*-Гены не действуют до тех пор, пока в клетку не попадает *индуктор*; он соединяется с репрессором и инактивирует его. Тогда *lac*-гены транскрибируются в форме единой полигенной матрицы.

В настоящее время известно много других оперонов, включая группы генов, определяющих образование ферментов биосинтетических путей. В этих случаях репрессор сам по себе неактивен и *активируется* при связывании с конечным продуктом соответствующего биосинтетического пути. Эта способность белка активироваться под действием малой молекулы, не имеющей структурного сходства с субстратом, позволяет предположить, что белок является аллостерическим.

Гены, определяющие синтез ферментов метаболических путей, не обязательно организованы в единые опероны. Например, у *E. coli* многие метаболические пути контролируются генами, «разбросанными» по хромосоме. В некоторых из этих систем синтез ферментов координируется продуктом единственного регуляторного локуса, что указывает на возможность связывания одного репрессора со многими рецепторами. В других случаях метаболические пути детерминируются генами, расположенными в разных участках генома и не регулируются при участии единого репрессора. Гены могут регулироваться по отдельности конечными продуктами пути, причем координация их активностей в этом случае гораздо менее точна.

Некоторые продукты регуляторных генов не репрессируют, а, напротив, *активируют* образование ферментов. Известно несколько таких систем, в том числе регуляция синтеза щелочной фосфатазы у *E. coli*. Этот фермент позволяет клетке получать фосфат за счет гидролиза органического фосфата среды. Если среда содержит много неорганического фосфата, синтез щелочной фосфатазы репрессирован. Это достигается активацией (под действием неорганического фосфата) репрессора — продукта гена-регулятора. Однако в отсутствие неорганического фосфата репрессорный белок существует в форме, *активирующей* (а не репрессирующей) синтез щелочной фосфатазы. Без продукта этого гена-регулятора щелочная фосфатаза не образуется, независимо от того, есть ли в среде неорганический фосфат. Этот механизм нужен для того, чтобы синтез щелочной фосфатазы был особенно чувствителен к присутствию неорганического фосфата, который превращает активатор синтеза фермента в репрессор.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ

МЕЖГЕННАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ: ЦИС-ТРАНС-ТЕСТ НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ

В начале настоящей главы мы определили ген как участок молекулы нуклеиновой кислоты, последовательность оснований которого задает последовательность аминокислот в определенной полипептидной цепи. Таким образом, ген — это *единица генетической функции*.

Предположим, что две или более мутации независимого происхождения изменяют одно и то же свойство вируса или клетки; тогда возникает вопрос: где локализованы эти мутации — в одном и том же гене или в ряде разных генов, каждый из которых должен функционировать, чтобы клетка с точки зрения исследуемого свойства была нормальной? Например, в клетках *E. coli* дикого типа имеется фермент трип-

тофансинтетаза, который катализирует сложную реакцию между индолилглицерофосфатом и серином с образованием триптофана и глицерофосфата (последний этап биосинтеза триптофана; см. рис. 7.22). Многие мутанты *E. coli* не обладают триптофансинтетазной активностью. Где произошли все эти мутации: в одном гене или в нескольких разных генах, каждый из которых участвует в образовании триптофансинтетазы? Последнее было бы возможно, если бы триптофансинтетаза состояла из двух или более *разных* полипептидных цепей.

Можно попытаться ответить на этот вопрос, проведя *цис-транс*-тест на генетическую функцию, предложенный С. Бензером (S. Benzer) в ходе исследований по генетике фагов. Состоит этот тест в следующем: два гаплоидных генома, каждый из которых несет независимую мутацию, затрагивающую одну и ту же функцию, совмещают в одной диплоидной клетке. В этом случае говорят, что две мутации находятся в *транс*-положении. Образуют другой диплоид, в котором обе мутации присутствуют в одном и том же геноме; в этом случае говорят, что мутации находятся в *цис*-положении. Эти два типа диплоидов показаны на рис. 13.16.

Из рис. 13.16 видно, что, когда две мутации находятся в двух разных генах, и *цис*-, и *транс*-диплоиды образуют такое же количество активного продукта гена, как и гаплоидная клетка дикого типа. Если же мутации расположены в одном гене, то *цис*-диплоид будет по-прежнему образовывать столько же активного продукта гена, сколько гаплоидный дикий тип, а *транс*-диплоид будет образовывать гораздо меньше продукта или не будет его синтезировать совсем¹. Этот последний результат и составляет смысл «негативного» *цис-транс*-теста.

С помощью *цис-транс*-теста были проверены многие пары мутантов по триптофансинтетазе. Полученные результаты показали, что триптофансинтетаза кодируется двумя генетическими областями, которые обозначают А и В. *Транс*-диплоиды, несущие две мутации в области А или две мутации в области В, не образуют триптофансинтетазу. Но если совместить любую мутацию в А-области в *транс*-диплоиде с мутацией в В-области, образуется такое же количество триптофансинтетазы, как в клетках дикого типа.

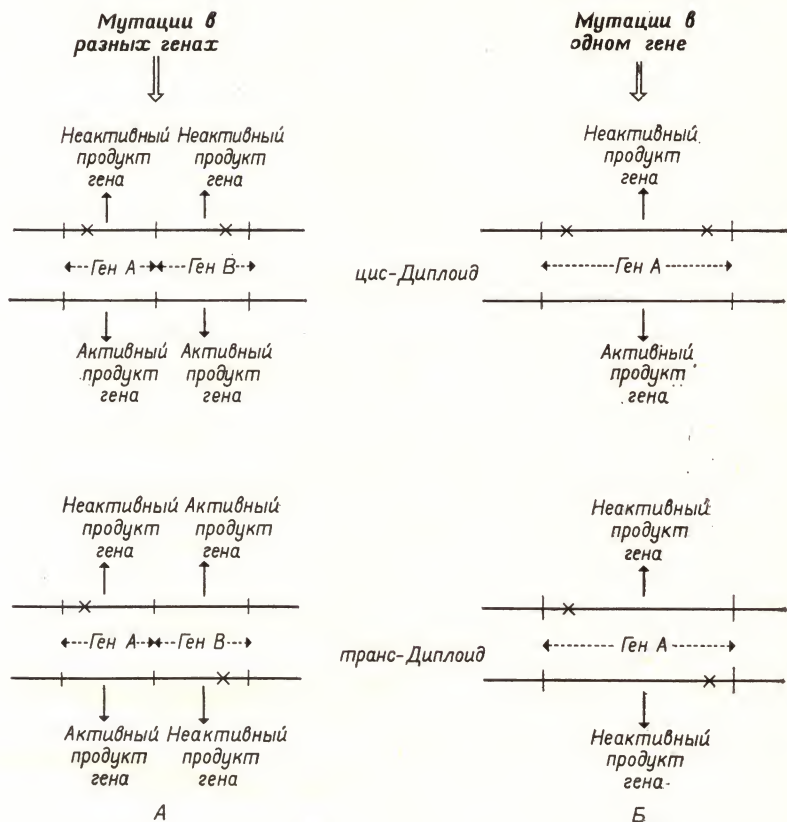
Таким образом, А- и В-области представляют собой единицы генетической функции. Для обозначения функциональной единицы, выявленной с помощью *цис-транс*-теста, Бензер предложил термин *цистрон*; следовательно, цистрон — генети-

¹ В соответствии с рис. 13.16 в том случае, если обе мутации расположены в одном гене, активный продукт гена в *транс*-диплоиде вообще не должен образовываться. Тем не менее часто небольшие количества фермента все-таки выявляются, что обусловлено внутригенной комплементацией. Это явление будет рассмотрено в следующем разделе.

Рис. 13.16. *Цис-транс-*тест на генетическую функцию. А. Если две мутации расположены в

разных генах, *транс-диплоид* образует столько же активного продукта гена, сколько *цис-диплоид*

ид. Б. Если две мутации расположены в одном гене, активный продукт гена образуется только в *цис-диплоиде*.



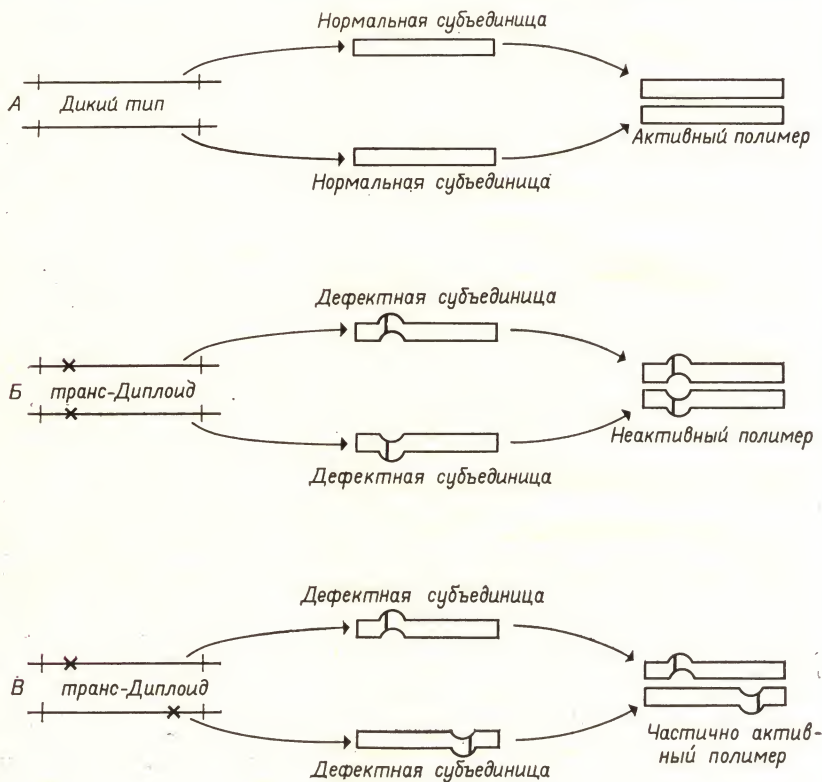
ческая область, в пределах которой любые две мутации дают отрицательный результат при *цис-транс-тесте*. Обычно считается, что цистроны соответствуют генам; однако для окончательного выяснения этого вопроса необходимо идентифицировать отдельные полипептиды — продукты цистронов. Это было сделано в случае А- и В-цистронов триптофансинтетазы *E. coli*: два полипептида, которые называют белок А и белок В, соединяются и образуют активную молекулу фермента.

Описанное выше явление, при котором два генома, несущие мутации в разных генах, комплементарны друг другу, что позволяет восстановить полноценный фенотип дикого типа, называется *межгенной комплементацией*. Однако возможна комплементация и между геномами, несущими мутации на разных концах одного гена, как это будет описано в следующем разделе.

Рис. 13.17. Внутригенная комплементация. А. Если в диплоидной клетке оба аллеля гена относятся к дикому типу, то субъединицы, представляющие собой продукт гена, агрегируют и

дают полноценный полимерный фермент. Б. Если оба аллеля диплоида несут одинаковую мутацию, дефектные субъединицы агрегируют и образуют неактивный полимерный фермент.

В. Если аллели диплоида несут две разные мутации, достаточно удаленные друг от друга, то образующиеся дефектные субъединицы могут агрегировать и давать частично активный полимер.



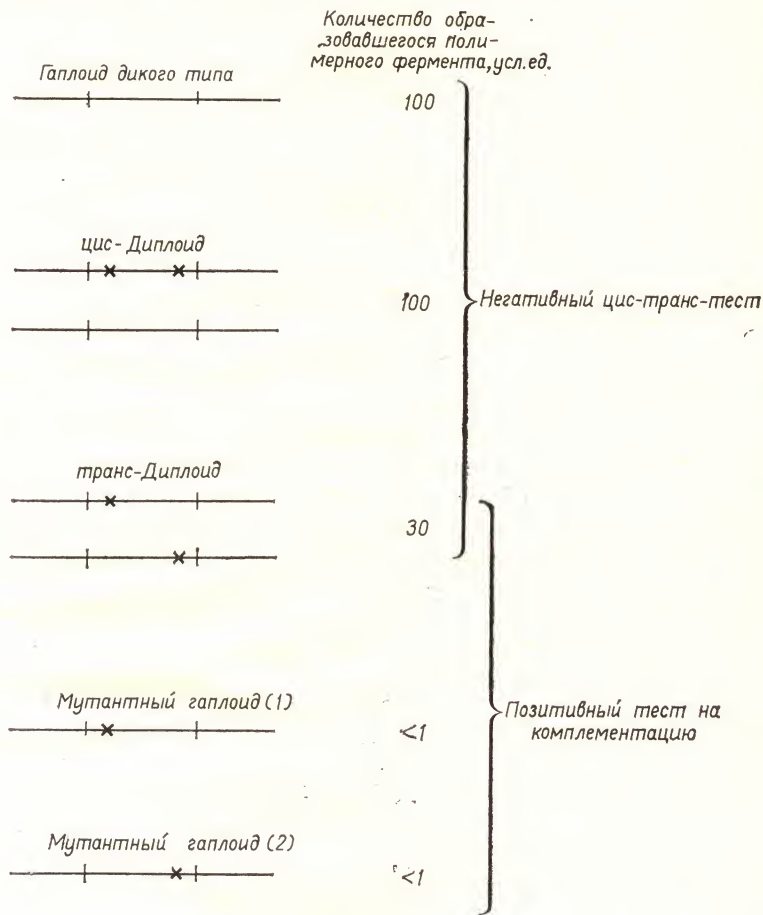
ВНУТРИГЕННАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ

Многие ферменты представляют собой полимерные белки, содержащие две и более идентичные субъединицы. Структура субъединиц определяется одним геном; несколько субъединиц ассоциируют и образуют активный фермент. Если в таком гене происходит мутация, то образуется дефектная субъединица и фермент инактивируется. Но если две разные мутации в этом гене совместить в *транс-диплоиде*, то дефектные субъединицы двух типов, которые они образуют, могут ассоциировать и образовать частично активный фермент (рис. 13.17). Это явление называется *внутригенной комплементацией*.

Рис. 13.18. Сравнение *цис-транс*-теста на генетическую функцию и теста на комплементацию. Если *транс*-диплоид образует значительно менее активный фермент, чем *цис*-диплоид, то

цис-транс-тест является негативным (говорит о том, что две мутации расположены в одном гене). На способность разных дефектных субъединиц комплементарно связываться друг с другом

указывает тот факт, что *транс*-диплоид образует гораздо более активный фермент, чем любой гаплоидный мутант (положительный тест на комплементацию).



Предположим, например, что гаплоидная клетка дикого типа образует 100 единиц данной ферментативной активности, а два разных гаплоидных мутанта — менее 1 единицы каждый. *Цис*-диплоид, содержащий оба мутантных аллеля, дает 100 единиц активности. Если в *транс*-диплоиде из двух мутантов обнаруживается 30 единиц активности, то результат соответствует *позитивному тесту на комплементацию*; он показывает, что дефектные субъединицы, образованные двумя мутантами, способны дополнять друг друга в составе поли-

мера. В то же время этот результат представляет собой негативный *цис-транс*-тест, так как *транс*-диплоид образует гораздо меньше активного фермента, чем *цис*-диплоид. Следовательно, мутации лежат в пределах одного цистрона (рис. 13.18).

МУТАЦИИ У БАКТЕРИОФАГОВ

Нуклеиновая кислота в составе зрелого вириона исключительно стабильна; даже если суспензии частиц бактериофага хранятся в течение длительного времени, спонтанные мутации практически не выявляются.

Однако мутации во внеклеточных фаговых частицах можно индуцировать, используя вещества или факторы, действующие непосредственно на ДНК. Так, фаговые частицы можно обрабатывать азотистой кислотой, алкилирующими агентами или облучать УФ-светом. В любом случае нуклеиновая кислота модифицируется, так что в ходе очередного цикла репликации, когда обработанные частицы заражат новые клетки-хозяева, возникнут замены пар оснований или другие стойкие изменения в последовательности оснований.

Геномы бактериофагов, реплицирующихся внутри хозяйских клеток в виде профага или вегетативного фага, подвержены как спонтанным, так и индуцированным мутациям. Во время репликации фага возникают все виды мутаций, описанные в начале главы; более того, имеющиеся в настоящее время данные о механизме этих мутаций получены главным образом на основании исследования мутаций у бактериофагов.

Взяв в качестве объекта бактериофаг Т4, Бензер задался следующим вопросом: одинакова ли вероятность мутирования различных сайтов (т. е. пар оснований) внутри одного гена, и если нет, то обладают ли участки, мутирующие под влиянием одного агента с повышенной частотой, такой же повышенной мутабельностью под влиянием других агентов?

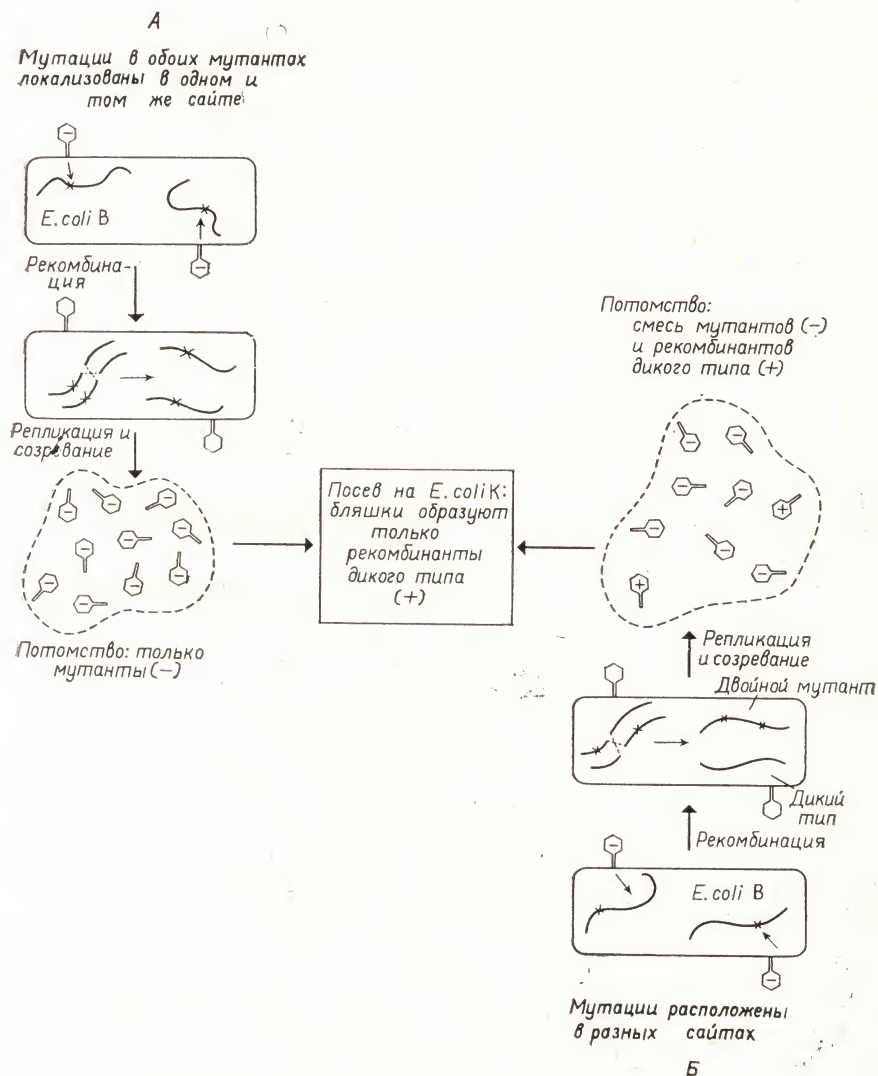
Для ответа на эти вопросы Бензер провел *тонкое картирование* мутаций в области гена *rII* фага Т4. Фаговые частицы, несущие аллель этого гена дикого типа, образуют при посеве на газон чувствительных клеток *E. coli* В небольшие расплывчатые бляшки. Фаговые частицы, несущие мутантные аллели гена *rII*, образуют большие, четко очерченные бляшки. Таким образом, мутанты по гену *rII* могут быть выделены без особого труда.

Бензер обнаружил, что частицы дикого типа (*rII*⁺) в отличие от мутантных по *rII* частиц способны образовывать бляшки на другом хозяине — *E. coli* К. При заражении штамма В смесью двух разных мутантов большая часть потомства будет относиться к родительским типам и, следовательно, не сможет образовывать бляшки на штамме К; но если два му-

Рис. 13.19. Тонкое картирование мутаций в гене *rII* фага Т4. А. Клетки *E. coli* В заражают совместно двумя мутантами *rII*. Поскольку оба мутанта несут мутации в одном и том же сайте локуса *rII*, при рекомбинации образуются только родительские ти-

пы мутантов *rII*, а не рекомбинанты дикого типа, способные давать бляшки на *E. coli* К. Б. Два мутанта *rII* несут мутации в разных сайтах. Кроссинговер между ними приводит к появлению двойного мутанта и рекомбинанта дикого типа (+). Если

посеять потомство на культуру *E. coli* К, то рекомбинанты дикого типа образуют бляшки. Чем дальше отстоят друг от друга мутационные сайты, тем выше частота кроссинговера между ними и тем больше число рекомбинантов дикого типа в потомстве от скрещивания.



тантных генома *rII* рекомбинируют и образуют рекомбинант *rII*⁺, эту частицу можно будет выявить по ее способности образовывать бляшки на штамме К.

Бензер выделил большое число мутантов по *rII* и скрестил их попарно. Каждую пару мутантов использовали для совместного заражения *E. coli* В, а потомство проверяли на присутствие рекомбинантов, способных давать бляшки на штамме К. Чем дальше друг от друга расположены две мутации в гене *rII*, тем выше число рекомбинантов; если же мутации занимают *один и тот же участок*, то рекомбинанты вообще не образуются (рис. 13.19).

Таким образом Бензер построил карту всего гена *rII*. Спонтанные мутации наблюдались примерно в 300 разных сайтах, каждый из которых представлял собой отдельную пару оснований. Однако распределение частот мутаций по сайтам было далеко не случайным: выявились две «горячие точки», одна из которых мутировала 52 раза, а вторая — 275 раз. Кроме того, распределение частот мутаций для разных агентов было неодинаковым: никакие два агента не давали сходной картины расположения «горячих точек».

«Горячие точки» не могут быть необычными парами оснований, поскольку известно, что в ДНК фага Т4 присутствуют только 4 вида обычных пар оснований. Особая чувствительность горячих точек к мутагенам обусловлена, по-видимому, влиянием соседних пар оснований; природа этого влияния неизвестна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Beckwith J. R., Zipser D. (eds.), 1970, The Lactose Operon, Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
Chromosome Structure and Function, 1973, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 38.
Drake J. W., 1970, The Molecular Basis of Mutation, San Francisco, Holden-Day.
Hartman P. E., Suskind S. R., 1969, Gene Action, 2nd ed., Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall.
Hayes W., 1968, The Genetics of Bacteria and Their Viruses, 2nd ed., Oxford, England, Blackwell. [Имеется перевод 1-го изд.: Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов. — М.: Мир, 1965.]
King R. C., 1972, A Dictionary of Genetics, 2nd ed., New York, Oxford University Press.
Stent G. S., 1971, Molecular Genetics, San Francisco, Freeman. [Имеется перевод: Стент Г. Молекулярная генетика. — М.: Мир, 1974.]
Woese C. R., 1967, The Genetic Code, New York, Harper and Row.

Обзоры

- Auerbach C., Kilben B. J. (1971), Mutation in Eukaryotes, Ann. Rev. Genetics, 5, 163.
Beckwith J., Rossow P. (1974), Analysis of Genetic Regulatory Mechanisms, Ann. Rev. Genetics, 8, 1.

- Boyer H. W.* (1971), DNA Restriction and Modification Mechanisms in Bacteria, *Ann. Rev. Microbiol.*, **25**, 153.
- Clark C. H., Shankel D. M.* (1975), Antimutagenesis in Microbial Systems, *Bacteriol. Rev.*, **39**, 33.
- Englesberg E., Wilcox G.* (1974), Regulation: Positive Control, *Ann. Rev. Genetics*, **8**, 219.
- Freese E.*, 1971, Molecular Mechanism of Mutation, in *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, Vol. I, A. Hollaender (ed.), New York, Plenum Press, pp. 1—56.
- Hartman P. E., Roth J. R.* (1973), Mechanisms of Suppression, *Adv. in Genetics*, **16**, 1.
- Newcombe H. B.* (1971), The Genetic Effects of Ionizing Radiations, *Ann. Rev. Genetics*, **16**, 240.
- Reznikoff W. S.* (1972), The Operon Revisited, *Ann. Rev. Genetics*, **6**, 133.
- Roth J. R.* (1974), Frameshift Mutations, *Ann. Rev. Genetics*, **8**, 319.

14 ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ВЫРАЖЕНИЕ МУТАНТНЫХ ГЕНОВ У ВИРУСОВ, В КЛЕТКАХ И КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Все свойства организма однозначно определяются его генами, включая гены органелл (митохондрий и хлоропластов эукариотических клеток), плазмид и хромосомные ядерные гены. Каждый ген может существовать в виде ряда структурных форм, или аллелей, природа которых обсуждалась в гл. 13. Совокупность аллелей всех генов клетки является ее *генотипом*.

Структурные и функциональные свойства клетки составляют ее *фенотип*. В данной главе мы обсудим, как генотип клетки определяет ее фенотип и каким образом изменения генотипа (мутации) обуславливают изменения фенотипа.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ НА ФЕНОТИП

СВЯЗЬ МЕЖДУ ФЕНОТИПОМ И ГЕНОТИПОМ

Согласно сказанному в гл. 13, каждый ген определяет структуру одного белка¹. Структурные и каталитические свойства белков в свою очередь определяют анатомические и метаболические свойства клеток. Белки взаимодействуют друг с другом, образуя новые структуры — сложные клеточные органеллы — и приобретая новые функциональные свойства для координации и регуляции метаболических путей. Поэтому мутация, приводящая к изменению структуры единичного белка, может вызвать глубокие вторичные изменения структуры и функции клетки.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ НА ПЕРВИЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ГЕНА

Чтобы не усложнять изложение, мы будем считать, что первичные продукты гена в клетке — белки, так как влияние мутаций на фенотип проявляется обычно через изменения структуры белка. Последние всегда связаны с изменениями аминокислотной последовательности в результате мутационного изменения последовательности пар оснований ДНК. Аминокислотная последовательность может измениться вследствие замещения одной аминокислоты другой, делеции или вставки нескольких аминокислот.

Все это приводит к одному из следующих эффектов:

¹ Единственным исключением являются операторные гены и гены, кодирующие рибосомные и транспортные РНК.

1. Может измениться каталитический центр фермента; это вызовет частичную или полную инактивацию белка как фермента.

2. Белок может стать чувствительным к ряду агентов: он может инактивироваться под действием высоких или низких температур, аллостерического эффектора, иона какого-либо металла и т. д. Термолабильность, возникшая вследствие мутации, — очень интересное явление, так как оно позволяет изучать мутации, затрагивающие ключевые функции клетки (см. ниже).

3. Полипептидные субъединицы полимерного белка могут неправильно ассоциировать и вследствие этого утратить свою обычную каталитическую или регуляторную функцию.

4. Возможно, что никаких заметных изменений физико-химических свойств или каталитической активности белка не произойдет. Это может быть в том случае, если одна аминокислота замещается другой с очень близкими свойствами (например, замещение одной кислой аминокислоты, глутамата, на другую кислую аминокислоту, аспарат).

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕОБЯЗАТЕЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ КЛЕТКИ

В зависимости от условий окружающей среды те или иные функции клетки являются необязательными, поэтому мутации, вызывающие утрату или изменение этих функций, можно изучать в условиях, позволяющих мутантам расти и делиться. Такие исследования, которые относятся к области *биохимической генетики*, внесли значительный вклад в наши представления о метаболических путях, регуляторных функциях и других аспектах клеточной физиологии.

К функциям клетки, необязательным при определенных условиях окружающей среды, относятся использование альтернативных источников углерода, азота, серы или фосфата; синтез предшественников макромолекул и коферментов; регуляция синтеза и активности ферментов; синтез различных компонентов клеточной поверхности — пептидогликана, капсулы, жгутиков, пилей. В следующих разделах мы вкратце рассмотрим некоторые примеры фенотипов, возникающих в результате утраты этих функций.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПИТАНИИ: ИСТОЧНИКИ ЭЛЕМЕНТОВ

Многие микроорганизмы способны использовать альтернативные виды соединений углерода, азота, серы и фосфата. Утрата способности использовать то или иное соединение элемента (в результате мутации, приводящей к инактивации белка, участвующего в использовании) восполнима при условии, что

в среде имеется другое подходящее соединение этого элемента. Мутации могут приводить к утрате ферментативной или транспортной активности. Например, неспособность использовать лактозу в качестве источника углерода может быть результатом инактивации β -галактозидазы или β -галактозидпермеазы.

Некоторые катаболические пути использования органических соединений описаны в гл. 6. Например, на рис. 6.13 изображены пути использования различных ароматических соединений псевдомонадами. Из этого рисунка видно, что утрата любого из ферментов сходящихся путей приведет к тому, что клетка не сможет использовать одно или несколько ароматических соединений в качестве источника углерода и энергии.

Многие микроорганизмы способны восстанавливать сульфат и нитрат, используемые для образования сульфгидрильных и аминокрупп соответственно. В обоих случаях этот процесс представляет собой ряд ферментативных реакций; утрата любого фермента приведет к возникновению потребности в более восстановленной форме серы или азота.

Большинство организмов могут использовать в качестве источника фосфора органические фосфаты, гидролизую их с образованием неорганического фосфата. Например, у *E. coli* это происходит под действием щелочной фосфатазы, локализованной в периплазме. Утрата активности щелочной фосфатазы вследствие мутации приводит к появлению у *E. coli* потребности в неорганическом фосфате.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПИТАНИИ: ФАКТОРЫ РОСТА

Если мутации вызывают инактивацию какого-либо фермента *необязательного биосинтетического пути*, клетка становится зависимой от присутствия в среде одного или нескольких факторов роста. Это фенотипическое проявление мутаций называется *ауксотрофностью*; исходное состояние, когда потребности в факторе роста нет, называется *прототрофным*. К необязательным биосинтетическим путям относятся только такие пути, в результате которых синтезируются небольшие молекулы, способные проникать в клетку и потому могущие служить факторами роста. К наиболее типичным факторам роста, которые могут стать необходимыми в результате ауксотрофных мутаций, относятся аминокислоты (предшественники белков), пурины и пиримидины (предшественники нуклеиновых кислот) и витамины (предшественники коферментов).

Пути биосинтеза аминокислот, пуринов и пиримидинов были в общих чертах описаны в гл. 7. Следует отметить, что в биосинтезе пуринов и пиримидинов участвуют фосфорили-

рованные интермедиаты и что конечными продуктами этих путей являются нуклеотиды. Ни интермедиаты, ни конечные продукты данных биосинтетических путей не могут поступать в качестве факторов роста в мутантные клетки, у которых эти пути блокированы, поскольку клетка непроницаема для сильно заряженных (и, следовательно, для фосфорилированных) соединений. Тем не менее биосинтетические пути для клетки не обязательны, если в среде содержатся соответствующие свободные пурины или пиримидины, поскольку клетка способна поглощать свободные основания и превращать их в нуклеотиды с помощью фосфорибозилтрансфераз (рис. 7.15).

Пути биосинтеза аминокислот построены таким образом, что утрата одной ферментативной активности может приводить к *различному проявлению ауксотрофности*. Один из вариантов возникает при утрате фермента, действующего до места разветвления пути; это — *множественная потребность в аминокислотах*. Например, при утрате любого фермента, участвующего в образовании хоризмовой кислоты в биосинтезе ароматических аминокислот (рис. 7.21), для роста клетки будут необходимы фенилаланин, тирозин, триптофан, *n*-оксибензойная, *n*-аминобензойная и 2,3-диоксибензойная кислоты. Однако, если путь блокирован до реакции образования этого соединения, все шесть конечных продуктов ароматического пути можно заменить шикимовой кислотой. Более поздние фосфорилированные интермедиаты не могут служить факторами роста. Множественная потребность возникает также при утрате ферментативной активности, общей для двух разных биосинтетических путей; например, потребность в изолейцине и валине возникает при инактивации одного фермента (рис. 7.25).

Другая разновидность ауксотрофности, обусловленной одной мутацией, — потребность в *одном из двух* соединений. Такая ауксотрофность возникает вследствие обратимости некоторых реакций: например, превращение серина в глицин легко обратимо, поэтому клетка, в которой блокирован биосинтез серина, может использовать в качестве фактора роста как серин, так и глицин (рис. 7.24).

УСТОЙЧИВОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ АГЕНТАМ

Мутационные изменения структуры белка могут приводить к повышенной устойчивости к антимикробным агентам как химической, так и физической природы. *Устойчивость к лекарственным препаратам*¹ возникает в результате различных изменений первичного продукта гена: клеточная мембрана мо-

¹ Антимикробные химические вещества, которые применяются в химиотерапии, обычно называют лекарственными препаратами.

жет стать непроницаемой для лекарственного препарата; клетка может приобрести ферментативную активность, расщепляющую лекарственный препарат или инактивирующую его путем химической модификации; все компоненты клетки, представляющие собой первичные мишени для действия препарата, могут приобрести пониженное средство к нему.

Ряд структурных аналогов обычных метаболитов подавляет рост микроорганизмов. Причины такого явления различны. В одних случаях аналог включается в макромолекулу (например, *n*-фторфенилаланин включается в белок вместо фенилаланина), в других аналог действует подобно природному метаболиту, влияя на определенный биосинтетический путь по типу ингибирования конечным продуктом, но не заменяя метаболит при осуществлении обычных функций клетки.

Устойчивость к аналогам возникает несколькими путями. Например, включению аналога в полимер может препятствовать мутация, изменяющая средство фермента, активирующего аминокислоту, к ее аналогу; устойчивость к ложному ингибированию конечным продуктом может возникнуть благодаря изменению аллостерического рецептора, чувствительного к ингибированию фермента.

Мутации могут приводить не только к повышению, но и к понижению устойчивости к антимикробным агентам. Например, чувствительность бактерий к УФ-свету сильно увеличивается при утрате одного из ферментов, осуществляющих репарацию ДНК, поврежденной УФ-светом. (Ферменты, участвующие в репарации ДНК, были рассмотрены в гл. 13.)

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ УТРАТЕ СПОСОБНОСТИ СИНТЕЗИРОВАТЬ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ

Все структуры клетки, расположенные вне клеточной мембраны, при определенных условиях окружающей среды являются необязательными. Например, клеточная стенка не нужна бактерияльным клеткам, растущим в изотонической среде; капсулы, жгутики и пили также не обязательны при выращивании клеток в обычных лабораторных условиях. Поэтому мутации, лишаящие клетки той или иной из этих структур, легко наблюдать в лабораторных условиях, а соответствующие изменения легко соотнести с изменениями первичных продуктов генов.

Жгутики и пили собираются из мономерных полипептидных субъединиц. Мутации в генах, детерминирующих эти полипептиды, могут препятствовать синтезу полимерных отростков, а это в свою очередь вызовет вторичные фенотипические изменения. Например, клетки со жгутиками значительно более подвижны и образуют на поверхности влаж-

ного агара обширные колонии; безжгутиковые мутанты дают на той же среде компактные колонии.

Пептидогликановый слой бактериальной клеточной стенки содержит диаминопимелиновую кислоту (ДАП), которая является последним интермедиатом биосинтеза лизина в бактериях (рис. 7.18). Если в результате мутации инактивируется один из ферментов, участвующих в пути биосинтеза лизина до реакции образования ДАП, то клетка будет нуждаться для роста и в ДАП, и в лизине. В присутствии ДАП клетка будет расти нормально, так как ДАП обеспечивает синтез лизина. Но если в среде содержится только лизин, клетка сможет синтезировать белки, но будет лишена ДАП для синтеза пептидогликана; ее клеточная стенка разрушится при низком осмотическом давлении. Такие клетки в среде с высоким осмотическим давлением растут в виде L-формы, а в обычной среде лизируются (L-формы клеток рассматривались в гл. XI).

Полисахаридная капсула бактериальной клетки синтезируется в ходе ряда ферментативных реакций, составляющих биосинтетический путь. Клетки, способные осуществлять всю последовательность реакций, инкапсулированы и образуют гладкие, часто слизистые колонии; мутанты, у которых нет того или иного фермента биосинтетического пути, лишены капсулы и образуют шероховатые колонии. У патогенных бактерий это фенотипическое изменение сопровождается потерей вирулентности, так как бактериальная капсула придает бактерии устойчивость к фагоцитозу в организме млекопитающего.

ПЛЕЙОТРОПНЫЕ МУТАЦИИ

Мутация, которая вызывает изменение двух и более разных свойств клетки, называется *плейотропной*. Плейотропия возникает в том случае, когда первичный или вторичный продукт гена выполняет более одной функции. Мы уже приводили пример такой мутации: инактивация фермента биосинтетического пути, лишаящая клетку капсулы, приводит к двум вторичным фенотипическим изменениям — к образованию шероховатых колоний и к потере вирулентности. Подобно этому, мутация, инактивирующая единственный компонент фосфотрансферной системы, лишает клетку способности использовать множество различных метаболитических неродственных сахаров.

ОТБОР И ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАНТОВ

Существуют три общих метода отбора мутантов микробов: отбор, основанный на разнице в скорости роста; отбор, основанный на разной способности к выживанию, и отбор, основанный на визуальном выявлении мутантов.

ОТБОР, ОСНОВАННЫЙ НА РАЗНИЦЕ В СКОРОСТИ РОСТА

При использовании этого метода клетки высевают на твердую среду с агаром, состав которой таков, что образуются видимые колонии только искомого мутанта; родительские клетки дикого типа не делятся или гибнут. Например, на агар, содержащий в качестве единственного источника углерода лактозу, можно посеять 10^6 или более клеток *lac*⁻ (не способных использовать для роста лактозу); вырастут и образуют колонии только редкие мутанты *lac*⁺, в то время как клетки *lac*⁻ делиться не смогут. Сходным образом на агар, не содержащий гистидина, можно посеять 10^6 или более клеток *his*⁻ (не способных синтезировать гистидин); вырастут и образуют колонии только редкие клетки *his*⁺. В другом случае селективная среда может быть составлена так, чтобы популяцию родительских клеток активно подавить и уничтожить, а не просто ограничить их рост. Например, если чувствительную к стрептомицину популяцию клеток посеять на агар, содержащий стрептомицин в концентрации, достаточной для уничтожения бактерий, родительские клетки погибнут, а редкие мутанты, устойчивые к стрептомицину, вырастут и образуют видимые колонии.

ОТБОР, ОСНОВАННЫЙ НА РАЗНОЙ СПОСОБНОСТИ К ВЫЖИВАНИЮ

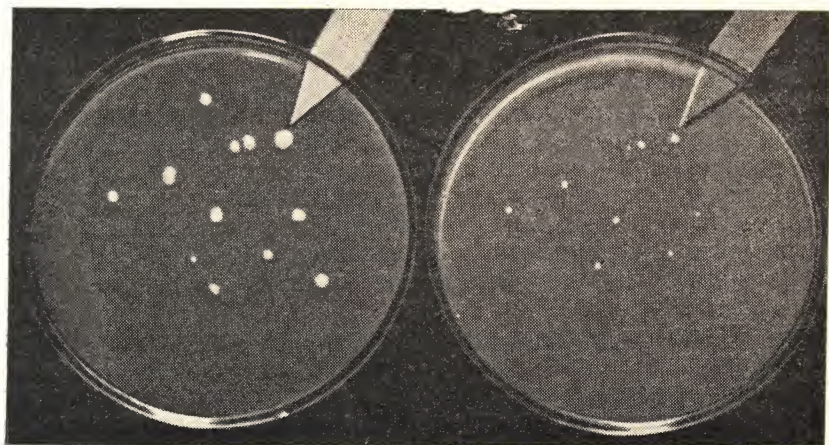
Этот метод отбора основан на использовании условий, при которых рост мутанта нужного типа подавляется, а в среду добавляется агент, убивающий только растущие (родительские) клетки. В результате клетки нужного мутанта не делятся и *переживают* летальные условия; после завершения процесса отбора их переносят в среду, поддерживающую рост. Например, пенициллин убивает только растущие клетки, и если добавить его в экспоненциальную культуру бактерий, растущую на минимальной жидкой среде¹, то бактерии дикого типа будут продолжать расти, до тех пор пока не будут убиты пенициллином. Если в культуре есть ауксотрофные мутанты, они не смогут расти в минимальной среде и, следовательно, выживут при обработке пенициллином. По окончании инкубационного периода выжившие клетки высевают на полноценную питательную среду,² а образующиеся клоны проверяют для подтверждения их ауксотрофности и для определения потребностей в факторах роста.

¹ Минимальная среда содержит минимальный набор питательных веществ, необходимых для роста организма дикого типа. Минимальная среда для *E. coli* содержит минеральные соли и источник углерода, например глюкозу.

Рис. 14.1. Перепечатка колоний. На исходной чашке с питательным агаром было 12 колоний (не показано). Колонии перепечатали на питательный агар (слева) и на синтетическую

среду без факторов роста (справа). Обе чашки ориентированы одинаково, а стрелкой указаны отпечатки одной и той же колонии. На сложной среде выросло двенадцать колоний, а

на синтетической среде — только девять. Три колонии, не давшие отпечатков на синтетической среде, образованы мутантами, для развития которых необходимы факторы роста.



ОТБОР, ОСНОВАННЫЙ НА ВИЗУАЛЬНОМ ВЫЯВЛЕНИИ МУТАНТОВ

При использовании этого метода условия посева на чашки должны быть подобраны таким образом, чтобы колонии мутантов нужного типа отличались на вид от колоний дикого типа. Например, бесцветное соединение тетразолий восстанавливается внутри клетки до ярко-красного нерастворимого продукта — формазана — лишь в узком интервале значений рН. Поэтому в полной среде, содержащей сбраживаемый сахар в высокой концентрации, клетки, способные сбраживать этот сахар, снижают рН до значения, при котором краситель не восстанавливается, что и приводит к образованию белых колоний. В то же время в мутантных клетках, не способных сбраживать содержащийся в среде сахар, тетразолий восстанавливается до формазана и образуются ярко-красные колонии. С помощью этого метода можно выявить на чашке Петри одну мутантную колонию, не сбраживающую сахар, среди 10^5 колоний дикого типа.

В некоторых случаях реагенты, позволяющие дифференциально окрасить мутантные колонии, летальны. Например, мутанты, образующие гликоген, можно выявить только с помощью окрашивания (и одновременного уничтожения) колоний иодом. В этих случаях используется метод *отбора сестринских колоний с помощью отпечатков*. Чашка, на которой

растут тысячи колоний, перепечатывается, как описано ниже, и отпечаток заливается раствором иода. Если при этом является гликоген-позитивная мутантная колония, то живые мутантные клетки для пересева можно получить с соответствующего места исходной чашки.

При перепечатке на цилиндрический блок из дерева или из металла диаметром чуть меньше чашки Петри натягивают кусок стерильного бархата. Блок поворачивают вверх той стороной, где натянут бархат, чашку Петри с колониями бактерий переворачивают и слегка прижимают к бархату. Многочисленные ворсинки бархата аналогичны иглам для посева; на них попадают клетки из всех колоний, растущих на чашке. Затем чашку Петри убирают и прикладывают к бархату свежий агар, чтобы получить посев от каждой колонии. При получении отпечатков чашки ориентируют одинаково по отметкам, нанесенным на их края, так что колонии, которые появляются на чашке с отпечатком, занимают такое же положение, как их сестринские колонии на исходной чашке (рис. 14.1).

Количество посевного материала на поверхности бархата обычно достаточно для того, чтобы сделать отпечатки на несколько различных чашек с агаром. Таким образом, метод отпечатков можно использовать для проверки клеток из очень большого числа колоний на исходной чашке на их способность расти на 8—10 различных селективных средах. Этот метод нашел применение в многочисленных экспериментах, заложивших основы генетики микробов и молекулярной генетики.

УСЛОВНОЕ ВЫРАЖЕНИЕ МУТАНТНОГО ГЕНА

Мутации, описанные в предшествующих разделах, выражаются в синтезе функционально измененных генных продуктов, т. е. ферментов, утративших свою ферментативную активность, или белков, утративших способность связывать эффекторы или ингибиторы. Однако многие мутации являются *условными*: при одних условиях, называемых *пермиссивными* (разрешающими), они не выражаются и в мутантной клетке образуется продукт гена, функционально неотличимый от продукта дикого типа; при других условиях, называемых *непермиссивными* (неразрешающими), мутации выражаются и образуется функционально измененный продукт. Ниже описаны некоторые механизмы условного выражения генов.

На основе явления условного выражения мутаций были выделены и изучены мутанты, у которых мутации лишают клетку *незаменимых функций*, т. е. *летальны при любых условиях культивирования*. Примерами мутаций этого класса могут быть мутации, инактивирующие ДНК-полимеразу III, РНК-полимеразу или аминоксил-тРНК-синтетазу: продукты

реакций, катализируемых этими ферментами, незаменимы для клетки и не могут поступать из окружающей среды. Такие мутации при проявлении обязательно летальны¹.

Многие *нелетальные* мутации также являются условными. Так, некоторые мутанты ауксотрофы при непермиссивных условиях, когда они образуют неактивный фермент биосинтеза, и прототрофы при пермиссивных условиях, когда они образуют активный фермент. Такая выраженная мутация не летальна, поскольку конечный продукт биосинтеза можно внести в среду.

Значение условных мутаций, особенно летальных, состоит в том, что при пермиссивных условиях мутант можно культивировать обычным образом, а затем в нужный момент перенести в непермиссивные условия и исследовать последствия выражения мутации физическими, химическими и микроскопическими методами. Например, перенеся мутант по аминоацил-тРНК-синтетазе из пермиссивных условий в непермиссивные, можно исследовать влияние на клетку внезапной остановки синтеза белка.

Существуют два разных способа условного выражения мутации. Один из них — *условное образование измененного белка*. В другом случае измененный белок образуется всегда, а условной является утрата его нормальной функции.

УСЛОВНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ИЗМЕНЕННОГО БЕЛКА

В гл. 13 мы рассмотрели один механизм условного выражения мутации — *генетическую супрессию*. Бактериофаг, несущий амбер-(нонсенс) мутацию в гене, выполняющем незаменимую функцию в пермиссивном хозяине (несущем амбер-супрессорную мутацию), будет развиваться нормально, а в непермиссивном хозяине (без супрессорной мутации) его развитие будет абортным. Например, если заразить непермиссивного хозяина мутантным фагом Т4, несущим амбер-мутацию в гене, ответственным за образование белка головки, клетка будет продуцировать только неполноценные фаги. Лизис происходит благодаря образованию фагового лизосома, но лизат содержит только компоненты хвоста фага.

Супрессия (в смысле коррекции трансляции) может происходить также на негенетическом уровне. Один из типов такой *негенетической супрессии* уже упоминался в гл. 13 — супрессия стрептомицином. В некоторых устойчивых к стрептомицину мутантах связывание стрептомицина с рибосомой

¹ Далее мы всюду будем применять термин «летальный» в смысле «летальный при всех условиях культивирования». Условные мутации, которые летальны при выражении, часто называли *условно-летальными*. Такая терминология является недостаточно четкой, поскольку условна не летальность мутации, а ее выражение. Даже ауксотрофность условно-летальна, т. е. летальна только в отсутствие необходимого фактора роста.

изменяет трансляцию мутантного кодона и восстанавливает функционально активную аминокислотную последовательность. Было исследовано много условных мутаций в пермисивных условиях, обеспеченных присутствием стрептомицина.

Второй тип негенетической супрессии имеет место в том случае, когда мутантная клетка получает возможность включать в состав своей информационной РНК 5-фторурацил (ФУ). В мутантном кодоне, содержащем урацил, при замещении урацила на ФУ последний при трансляции часто прочитывается как А, поскольку ФУ образует иные водородные связи, чем У. Это изменение дает возможность аминокислоте, свойственной дикому типу, встроиться в нужное место, благодаря чему восстанавливается нормальная функция белка.

УСЛОВНАЯ УТРАТА НОРМАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ БЕЛКА

Во многих случаях измененный в результате мутации белок теряет свою нормальную активность только при определенных условиях окружающей среды. Известно два типа таких мутаций: *температурочувствительные мутации* (включая тепло- и холодоchувствительные варианты) и мутации, *чувствительные к концентрации соли*.

Теплоchувствительные мутации — это мутации, придающие белку термолабильность при температурах, близких к максимальным в физиологическом интервале температур для данного организма. Например, многие белки *E. coli* изменяются за счет мутаций так, что при 40°C они денатурируют, а при 30°C остаются интактными. Известны мутантные белки, которые, напротив, не могут функционировать при минимальной температуре физиологического интервала допустимых температур, но работают при высоких температурах; такие мутации называются *холодоchувствительными*.

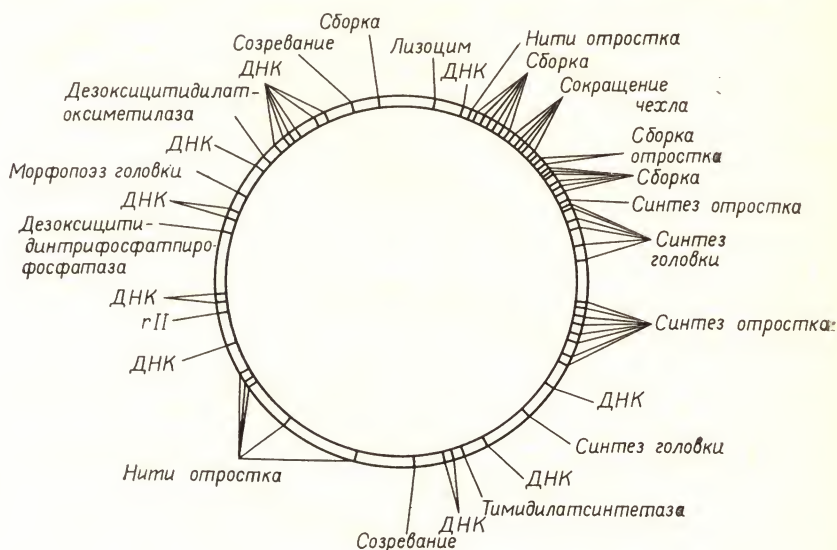
Известно большое число мутантов, нормально растущих в средах с высоким, а не с низким осмотическим давлением. Такие *чувствительные к концентрации соли* мутанты, как оказалось, содержат измененные в результате мутаций ферменты, которые денатурируют, если они не стабилизированы высокими концентрациями соли.

Таким образом, температурочувствительные и чувствительные к концентрации соли мутации относятся к тому классу мутаций, в основе условного выражения которых лежит утрата функции измененного белка, а не присутствие или отсутствие его в клетке.

УСЛОВНО-ЛЕТАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ В БАКТЕРИОФАГАХ

Большинство продуктов вирусных генов совершенно необходимо для образования нормальных вирусных частиц: хотя 252 вирус устойчив к некоторым изменениям белков оболочки и

гены. Заметим, что многие гены, обладающие родственными функциями, сгруппированы.



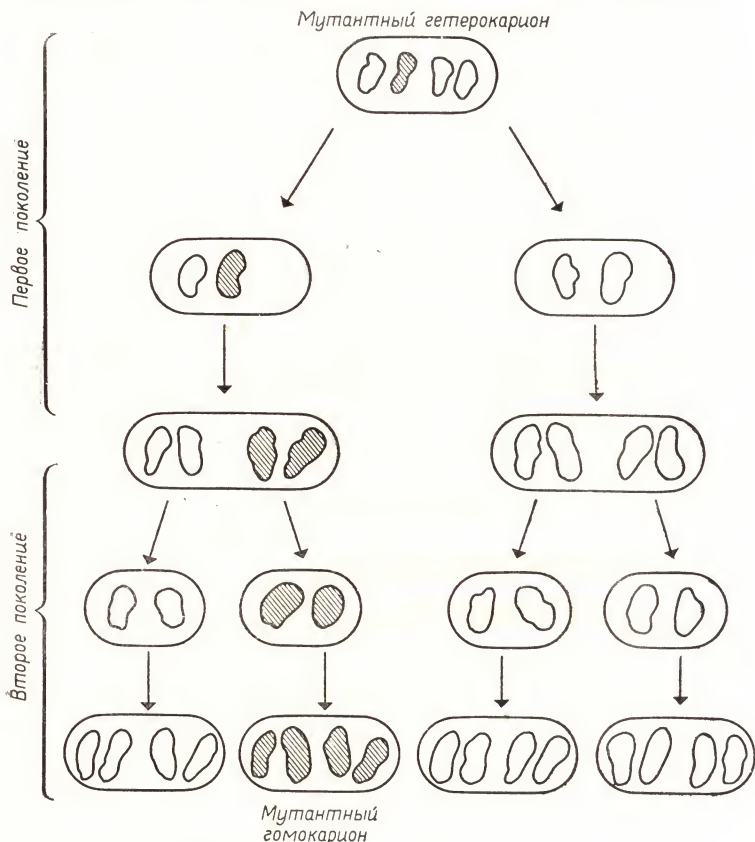
Однако явление условного выражения мутаций позволило выделить и изучить мутации почти по всем фаговым генам. У фага Т4 были обнаружены температурочувствительные и генетически «супрессируемые» нонсенс-мутации всех функций фага; их удалось картировать с помощью методов генетической рекомбинации, которые будут обсуждаться в гл. 15. Упрощенная генетическая карта фага Т4 приведена на рис. 14.2.

Если первичным результатом мутации является утрата стабильного продукта гена, до фенотипического проявления мутации может пройти несколько поколений. Эта задержка называется *задержкой фенотипического выражения*; она может быть обусловлена тем, что для сегрегации хромосом или для разбавления активного продукта гена, который больше не синтезируется, необходимо некоторое время.

Рис. 14.3. Бактериальные клетки с двумя и четырьмя хромосомами. Если мутация происходит в клетке с четырьмя

хромосомами, для появления мутантного гомокариона необходимо два поколения. Если мутация рецессивна, она не

может проявиться до тех пор, пока не произойдет полного разделения мутантной и не-мутантной хромосом.



ЗАДЕРЖКА ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ВЫРАЖЕНИЯ: СЕГРЕГАЦИЯ ХРОСОМ

Большинство бактерий в экспоненциальной фазе роста содержат в среднем две-четыре хромосомы на клетку. Они генетически идентичны, поскольку происходят из одной хромосомы, которая присутствовала в клетках данной линии одно или два поколения назад. Если в одной из хромосом происходит мутация, клетка становится *гетерокарионом*. Если мутация вызывает утрату продукта гена, то в гетерокарионе она будет *рецессивной*, так как другие хромосомы продолжают продуцировать этот продукт. Поэтому для сегрегации хромосом и образования мутантной клетки гомокариона должно

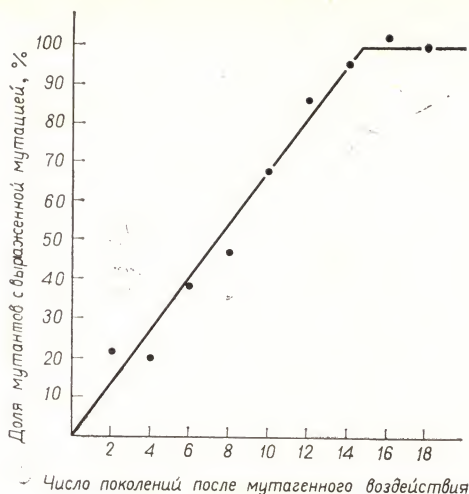


Рис. 14.4. Задержка фенотипического выражения мутации. Суспензии чувствительных к фагу бактерий обрабатывали мутагеном и выжившие клетки посеяли на агар, покрытый суспензией фага. На агаре появляются только колонии мутантов, устойчивых к фагу. В этом опыте до посева на чашки выжившие клетки давали разное число поколений потомства.

пройти одно-два клеточных поколения, что позволит мутации, вызвавшей утрату, выразиться фенотипически. Это положение иллюстрирует рис. 14.3.

Бактерия — гаплоидный организм, поскольку все ее хромосомы идентичны. Даже если в результате мутации возникнет генетическая гетерогенность, или, как будет описано в гл. 15, произойдет внутриклеточный перенос генов, через несколько поколений благодаря делению клеток и сегрегации хромосом восстановится гаплоидное состояние.

ЗАДЕРЖКА ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ВЫРАЖЕНИЯ: РАЗБАВЛЕНИЕ АКТИВНОГО ПРОДУКТА ГЕНА

Если суспензию чувствительных к фагу бактерий обработать мутагеном (см. гл. 13) и сразу посеять выжившие клетки на чашки с агаром, покрытым суспензией фага, индуцированных мутантов, устойчивых к фагу, почти не образуется. Но если дать выжившим клеткам возможность перед посевом на чашки поделиться несколько раз в питательной среде, выявится большое число устойчивых мутантов. Типичный результат такого эксперимента показан на рис. 14.4, из которого видно, что для выражения некоторых индуцированных мутаций необходимо целых 14 поколений.

Причина этой задержки фенотипического выражения стала ясна, когда был открыт механизм устойчивости к фагу. Чувствительная бактерия адсорбирует фаг посредством особых рецепторов клеточной стенки; у устойчивых мутантов этих рецепторов нет. В тот момент, когда чувствительная клетка претерпевает генетическое изменение и становится нечувствительной, ее стенка все еще содержит предохра-

вавшие рецепторные участки и клетка остается фенотипически чувствительной к фагу. Однако при дальнейшем росте рецепторы больше не синтезируются, а старые разбавляются благодаря синтезу нового материала клеточной стенки. Таким образом, фенотипическое выражение мутации устойчивости задерживается до тех пор, пока мутировавшая клетка не будет иметь слишком мало рецепторов для успешной адсорбции фага.

Задержка фенотипического выражения происходит во всех случаях, когда первичным результатом мутации является утрата стабильного продукта гена. Следовательно, этот эффект должен наблюдаться при мутациях от прототрофности к ауксотрофности и при мутациях, лишаящих клетку способности использовать определенные источники углерода или азота. В каждом из этих случаев первичным результатом мутации является утрата ферментативной активности; в момент мутации клетка обладает большим количеством молекул фермента, которые должны разбавиться в процессе роста и деления клетки для того, чтобы мутация стала заметной.

Практическое значение задержки фенотипического выражения можно продемонстрировать на примере использования «пенициллинового метода» для отбора ауксотрофных и других мутантов, утративших какую-либо ферментативную активность. Этот метод основан на том, что пенициллин убивает только активно растущие клетки. Если выжившие после воздействия мутагена клетки сразу же обработать пенициллином, то мутанты гибнут с такой же эффективностью, как и клетки дикого типа. Поэтому выжившим клеткам необходимо дать возможность поделиться несколько раз до обработки пенициллином, чтобы мутации «утраты» имели время для фенотипического выражения.

Если мутация выражается в приобретении способности синтезировать продукт гена, а не в ее утрате, фенотипическое выражение происходит практически мгновенно. Если, например, ауксотроф мутирует и восстанавливает способность образовывать фермент биосинтеза, то активные молекулы фермента сразу же начинают синтезироваться и принимают участие в работе биосинтетического пути, который был до этого блокирован.

ДИНАМИКА ПОПУЛЯЦИИ

Растущая популяция клеток микробов в отношении присутствия в популяции мутантных клеток находится в динамическом состоянии. Это состояние определяется двумя параметрами: *скоростью мутирования*, которую можно считать постоянной, и *частотой встречаемости мутантов* (долей мутантов), которая является изменяющимся параметром и зависит от скорости мутирования и скорости отбора данного типа мутантов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ МУТИРОВАНИЯ

Скорость мутирования в популяции клеток микробов можно определить как вероятность того, что какая-либо клетка мутирует в течение определенного промежутка времени. Первые измерения скорости мутирования бактерий были выполнены Луриа и Дельбрюком (Luria, Delbrück) в 1943 г., в то время, когда природа генетического материала и механизм мутаций были еще неизвестны. Они выбрали в качестве временного параметра цикл деления, или время генерации бактерии, поэтому их формула скорости мутирования представляет собой число мутаций на одну клетку за одну генерацию, усредненное по многим генерациям. Как уже обсуждалось в гл. 13, большинство спонтанных мутаций возникает в результате ошибок матричного синтеза при репликации ДНК. Поскольку в обычных условиях репликация ДНК и деление клетки связаны между собой, формула Луриа — Дельбрюка справедлива для нормальных физиологических условий роста микробов.

Согласно формуле Луриа — Дельбрюка, скорость мутирования — это вероятность того, что при увеличении вдвое размера клетки и ее делении пополам произойдет мутация. Эта последовательность событий называется *клеточной генерацией*. Число клеточных генераций можно легко определить для любой культуры, так как каждая генерация увеличивает число клеток в культуре на одну. Поэтому число клеточных генераций равно приросту числа клеток за время культивирования, т. е.

$$n - n_0,$$

где n — число клеток в конце культивирования, а n_0 — число клеток в нулевой момент времени. В это выражение следует внести поправку, поскольку в момент отбора пробы культуры для измерения n клетки находятся на разных стадиях следующего цикла деления. При экспоненциальном росте несинхронизированная культура переходит к следующей генерации таким образом, что истинное число клеточных генераций, которые произошли в культуре, выражается уравнением

$$\frac{n - n_0}{\ln 2} = \frac{n - n_0}{0,69},$$

где $\ln 2$ — логарифм 2 по основанию e . Скорость мутирования равна среднему числу мутаций за одну клеточную генерацию; таким образом, получается следующее уравнение:

$$a = \frac{m}{\text{Число клеточных генераций}} = \frac{m}{(n - n_0)/0,69} = 0,69 \frac{m}{n - n_0},$$

где a обозначает скорость мутирования, а m — среднее число мутаций, происшедших за время увеличения числа клеток от n_0 до n .

Итак, чтобы определить скорость мутирования в данной культуре, необходимо определить *m*. Это легко сделать, если мутации происходят в популяции клеток, растущих на твердой среде. При таких условиях каждая мутация дает начало мутантному клону, закрепленному на месте и выявляемому после соответствующих манипуляций как одиночная колония.

На практике следует дать возможность популяции клеток поделиться ограниченное число раз на поверхности чашки с агаром, а затем так изменить условия, чтобы продолжить рост и образовать видимые колонии могли только мутантные клоны. Для создания таких условий был разработан ряд методов; достаточно привести два примера.

1. Клетки ауксотрофного штамма высевает на минимальный агар, содержащий достаточное количество необходимого фактора роста для обеспечения ограниченного числа делений. Затем рост клеток родительского типа прекращается; любые прототрофные мутанты, которые уже не нуждаются в факторах роста, продолжают расти и образовывать видимые колонии. Число таких мутантов, присутствующих в инокуляте, следует вычесть из общего числа мутантов; число мутантов, имеющих в инокуляте, определяют путем посева на чашки с агаром без фактора роста.

2. Популяцию чувствительных к стрептомицину клеток помещают на мембранный фильтр и кладут его на некоторое время на питательный агар. Затем мембрану переносят на поверхность питательного агара со стрептомицином; чувствительные родительские клетки гибнут, тогда как устойчивые мутанты, возникшие за время роста на питательном агаре, образуют видимые колонии. Число устойчивых мутантов в инокуляте определяют, помещая контрольные мембраны на питательный агар со стрептомицином в нулевой момент времени.

В каждом из этих примеров число колоний на чашку (скорректированное путем вычитания числа мутантов в инокуляте) равно числу *мутаций* на чашку. Теперь остается только определить число клеточных генераций на чашку. Для этого клетки с нескольких чашек смывают известным объемом жидкости и подсчитывают жизнеспособные клетки. Число клеточных генераций, как указывалось выше, равно $(n - n_0)/0,69$; здесь n — среднее число клеток на одной чашке в момент гибели или подавления роста популяции родительских клеток, а n_0 — среднее число клеток на чашку в исходном инокуляте.

Пусть, например, на ряд мембранных фильтров нанесли по $1,0 \cdot 10^6$ чувствительных к стрептомицину клеток. Одну группу фильтров поместили в нулевой момент времени на агар со стрептомицином и среднее число устойчивых мутантов в инокуляте оказалось равным 1,2 на фильтр. Другую

ровали 6 ч. После инкубации половину мембран поместили на агар со стрептомицином, а половину использовали для определения числа жизнеспособных клеток. Оказалось, что число жизнеспособных клеток составляет $1,0 \cdot 10^9$ клеток на фильтр; на чашках со стрептомицином после инкубации было в среднем по 4,2 колонии на фильтр. Скорость мутирования a вычисляется следующим образом:

$$a = 0,69 \frac{m - m_0}{n - n_0},$$

где m — окончательное число мутантных колоний, а m_0 — число мутантов в инокуляте. Подставляя числа, полученные в эксперименте, получаем

$$a = 0,69 \frac{4,2 - 1,2}{1,0 \cdot 10^9 - 1,0 \cdot 10^6} = \frac{2,1}{1,0 \cdot 10^9}.$$

Итак, скорость мутирования — приобретения устойчивости к стрептомицину — равна $2,1 \cdot 10^{-9}$ на клеточную генерацию.

Число мутаций, происходящих в *жидкой* культуре микробных клеток, можно определить статистическим методом, как показали Лурия и Дельбрюк в своей оригинальной статье. Популяцию клеток дикого типа (например, чувствительных к стрептомицину) используют для заражения серии из 20 или более культур, причем каждый инокулят настолько мал, что не содержит мутантов по чувствительности к стрептомицину. Когда плотность клеток в культурах станет достаточно высокой, содержимое каждой пробирки наносят на чашку с агаром, содержащим стрептомицин. Чашки инкубируют, пока не вырастает достаточно крупные колонии устойчивых к стрептомицину мутантов, чтобы их можно было подсчитать.

В большинстве случаев число мутантов, выявляемых на чашке, ничего не говорит нам о числе *мутаций*, которые произошли в соответствующей пробирке; например, 16 мутантов могли получиться в результате 16 мутаций, происшедших на протяжении последнего поколения, или в результате одной мутации, происшедшей на 4 поколения раньше. Исключением являются только чашки без мутантов: они соответствуют культурам, в которых не *произошло ни одной мутации*.

Лурия и Дельбрюк показали, что среднее число мутаций во всей популяции связано с долей культур, в которых не произошло мутаций, формулой, описывающей распределение Пуассона для нулевого числа событий¹:

¹ Распределение Пуассона описывает долю субкультур популяции, в которых произошло 0, 1, 2, 3, ..., n мутаций, если число клеток в субкультуре много больше числа мутаций.

$$P_0 = e^{-\bar{m}},$$

где P_0 — доля культур, не содержащих мутантов (и, следовательно, культур, в которых не произошло мутаций), а \bar{m} — среднее число мутаций в культуре.

Отсюда

$$\bar{m} = -\ln P_0.$$

Если, например, в 30% культур не произошло мутаций, то P_0 равно 0,3 и $\bar{m} = -\ln 0,3$, т. е. примерно 1,0. Предположим, что каждая культура росла начиная с инокулята, содержащего $1 \cdot 10^4$ клеток, до окончательного размера популяции в $1 \cdot 10^9$ клеток.

Тогда скорость мутирования равна

$$a = 0,69 \frac{\bar{m}}{n - n_0} = \frac{0,69 \cdot 1,0}{1 \cdot 10^9 - 1 \cdot 10^4} = \frac{0,69}{1 \cdot 10^9} = 0,69 \cdot 10^{-9}.$$

На практике проводят предварительный эксперимент для определения подходящего инкубационного периода. Если, например, культуры будут расти слишком долго, каждая из них будет содержать более одного мутанта и метод окажется неприменимым.

МУТАЦИОННОЕ РАВНОВЕСИЕ

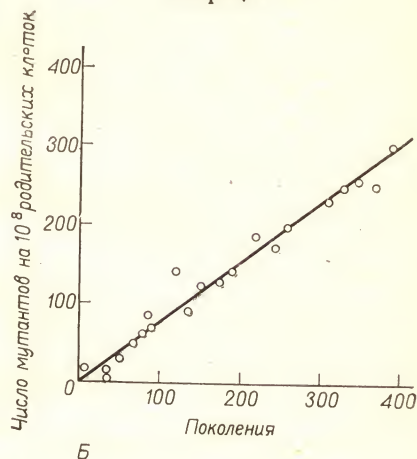
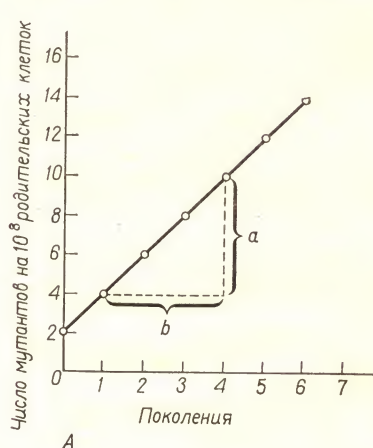
Между скоростью мутирования и увеличением доли мутантов в культуре в каждом поколении имеется прямая связь, которая позволяет предположить, что ни мутантный, ни родительский генотип не имеет селективного преимущества. Предположим, например, что культура начала расти с небольшого инокулята и что две первые мутации произошли в тот момент, когда в культуре имеется $1 \cdot 10^8$ клеток. В этом случае доля мутантов в культуре составляет $2 \cdot 10^{-8}$. Культура продолжает расти, и после следующей генерации имеется уже $2 \cdot 10^8$ родительских клеток. Но мутанты тоже делятся, и теперь в культуре присутствует 4 мутанта на $2 \cdot 10^8$ клеток; доля мутантов остается равной $2 \cdot 10^{-8}$. Если не произойдет новых мутаций и мутантные клетки делятся с такой же скоростью, как родительские, эта доля останется постоянной.

Предположим, что мутации все-таки продолжают возникать с вероятностью $2 \cdot 10^{-8}$ на клеточную генерацию. Тогда при каждом делении на каждые 10^8 родительских клеток в культуре добавятся два новых мутанта и соотношение мутантов и клеток родительского типа возрастет в соответствующее число раз. Такое возрастание числа мутантов показано в табл. 14.1 и на рис. 14.5. На рис. 14.5 наклон прямой a/b непосредственно соответствует скорости мутирования; единицы, в которых выражается этот наклон, — число мутантов, возникающих при одном делении 10^8 клеток.

Рис. 14.5. Увеличение доли мутантов в культуре в результате спонтанного мутирования. А. Теоретическое увеличение при появлении ровно двух мутантов на каждые 10^8 клеток за поко-

ление. Скорость мутирования ($2 \cdot 10^{-8}$ за одну генерацию) равна наклону прямой, т. е. отношению a/b , ($6 \cdot 10^{-8}$)/3. Б. Экспериментальные данные. Долю мутантов в культуре определяли

с помощью посева на чашки через определенные промежутки времени. Оказалось, что скорость мутирования, определенная по наклону полученной прямой, составляет $0,75 \cdot 10^{-8}$ на генерацию.



Что произойдет, если такая популяция будет бесконечно расти? На первый взгляд кажется, что доля мутантных клеток будет возрастать до тех пор, пока не достигнет 100%. Однако этому препятствует *обратное мутирование*. Многие мутанты способны переходить в исходное состояние, и этот

ТАБЛИЦА 14.1
ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ДОЛИ МУТАНТОВ В РАСТУЩЕЙ КУЛЬТУРЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ НОВЫХ МУТАЦИЙ

Поколение	Среднее число родительских клеток в по- колении	Число мутантных клеток ¹			Соотношение мутантов и родительских клеток
		новые	старые	сумма	
n	1×10^8	2		2	2×10^{-8}
n + 1	2×10^8	4	2	8	4×10^{-8}
n + 2	4×10^8	8	4	24	6×10^{-8}
n + 3	8×10^8	16	8	64	8×10^{-8}
n + 4	16×10^8	32	16	160	10×10^{-8}

¹ Числа, обведенные пунктиром, показывают, сколько было бы мутантов, если бы после первых двух мутаций не происходило новых мутаций. Отметим, что тогда доля мутантов оставалась бы постоянной — $2 \cdot 10^{-8}$.

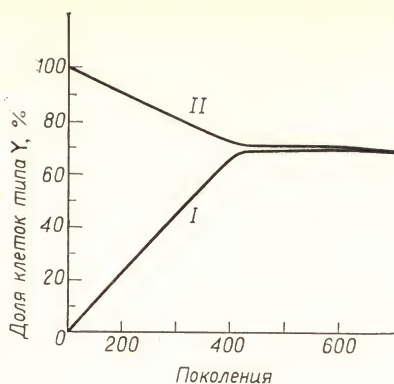


Рис. 14.6. Достижение равновесного содержания мутантов в культуре. Кривая I соответствует эксперименту, в котором исходная популяция не содержала клеток Y. В результате прямых мутаций доля клеток Y увеличивалась, пока не достигла примерно 70%. В этот момент обратное и прямое мутирование уравнили друг друга. Кривая II соответствует эксперименту, в котором исходной была чистая культура типа Y. В результате мутаций Y→X доля клеток Y уменьшалась, пока снова не установилось равновесие на уровне 70%.

процесс имеет свою собственную характерную скорость. Если в популяции бактерий накопилось достаточно большое число мутантов, то число обратных мутаций становится значительным; доля мутантов неизбежно установится на таком уровне, при котором количества прямых и обратных мутаций в точности уравнивают друг друга. Предположим, например, что в популяции клеток типа X с определенной скоростью происходит мутирование X→Y. По мере роста популяции доля мутантов Y будет увеличиваться. Когда возникнет достаточное количество клеток Y, станет заметным обратный процесс, мутирование Y→X, и популяция в конце концов достигнет истинного равновесия, при котором число прямых мутаций (X→Y) в точности равно числу обратных мутаций (Y→X) в каждом поколении. Начиная с этого момента доля мутантов останется постоянной.

Рис. 14.6 иллюстрирует тот факт, что независимо от того, начинается ли рост с чистой культуры клеток типа X или с чистой культуры клеток типа Y, равновесное содержание мутантов Y одно и то же. Численное значение его зависит от относительных скоростей прямого и обратного мутирования. Если, например, эти скорости равны, то число клеток X и Y в равновесии будет одинаковым. Соотношение между числом клеток X и Y выражается следующей простой формулой:

$$\text{Доля клеток Y в равновесии} = \frac{\text{Скорость мутирования (X} \rightarrow \text{Y)}}{\text{Скорость мутирования (Y} \rightarrow \text{X)}}.$$

Таким образом, в отсутствие отбора и при бесконечно большом времени роста популяции доля мутантов станет постоянной (равновесной).

ВЛИЯНИЕ ОТБОРА
НА СООТНОШЕНИЕ
РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МУТАНТОВ

В предыдущем разделе, посвященном мутационному равновесию, мы видели, что доля мутантов данного типа в микробной популяции возрастает в отсутствие каких-либо селективных преимуществ пропорционально скорости мутирования. Предположим, например, что мы получили путем мутагенеза штамм *E. coli*, нуждающийся для роста в гистидине. Чистую культуру этого штамма (обозначим его в данном случае h^-) высевает на косяк. Подростая культура на косяке будет содержать примерно один мутант h^+ (способный синтезировать гистидин и, следовательно, не нуждающийся в нем для роста) на каждый миллион клеток h^- . Эта доля будет увеличиваться в каждом последующем поколении при переносе основной культуры с косяка на косяк. Среда содержит достаточное количество гистидина, так что никакие клетки не имеют селективного преимущества. Предположим, что на каждом косяке проходит примерно 10 генераций и что культуру переносят несколько раз в год; тогда через несколько лет культура будет содержать сильно возросшее относительное число h^+ -клеток.

Однако на практике это происходит редко, даже если вычисления, основанные на наблюдаемых скоростях прямого и обратного мутирования, предсказывают, что такое увеличение произойдет. На самом деле кажущееся равновесие устанавливается задолго до того, как оно должно было быть достигнуто, причем всегда преобладает тот генотип, с которого началось выращивание культуры. Доля мутантных клеток в культуре возрастает только до очень низкой величины, примерно до $1 \cdot 10^{-6}$, и остается на этом уровне.

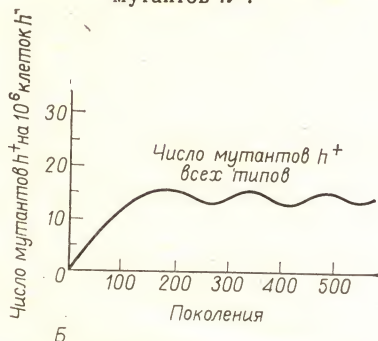
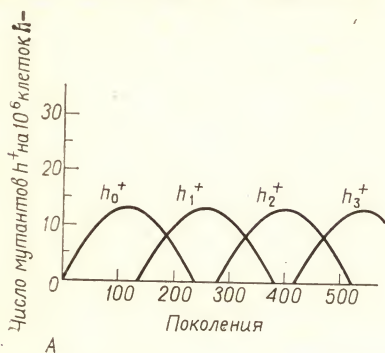
Этот загадочный факт, как оказалось, обусловлен явлением *периодического отбора* (рис. 14.7). В популяции бактерий довольно регулярно возникают мутанты, которые лучше приспособлены к окружающей среде и которые в конце концов вытесняют родительский тип в результате отбора. Возможно, они имеют большую скорость роста, чем родительские клетки, или выделяют метаболические продукты, ингибирующие эти клетки. Как бы то ни было, лучше приспособленные мутанты растут быстрее остальных клеток и могут быть в свою очередь вытеснены только мутантом, приспособленным еще лучше. Процесс замещения может повторяться многократно, так как продолжают возникать все новые мутанты, способные вытеснить преобладающий тип из популяции. Это периодическое изменение популяции оказывает непосредственное влияние на равновесную долю всех остальных мутантов.

263 Обратимся к рассмотренному выше конкретному примеру с мутантами h^+ . Предположим, что в тот момент, когда доля

Рис. 14.7. Периодический отбор. А. Последовательное появление и исчезновение различных мутантов h^+ . Б. Использо-

ваны те же данные, но по оси ординат отложено суммарное число мутантов h^+ всех разновидностей. Получается

кривая колебательного характера, выходящая на уровень, который соответствует псевдоравновесному уровню доли мутантов h^+ .

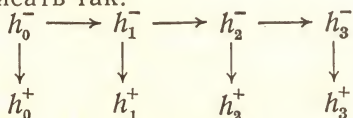


клеток h^+ достигла значения 10^{-6} , в культуре появляется более приспособленный мутант. Теоретически он может возникнуть и из клеток h^- , и из клеток h^+ , но, поскольку на каждую клетку h^+ приходится 10^6 клеток h^- , вероятность того, что мутант нового типа возникнет из популяции h^- , составляет миллион к одному.

Таким образом, хорошо приспособленный мутант будет иметь селективное преимущество перед всеми другими клетками популяции, которых он вскоре вытеснит. Поскольку этот хорошо приспособленный мутант генетически является мутантом h^- , то под давлением отбора все клетки h^+ должны будут исчезнуть из популяции.

Однако полному исчезновению клеток h^+ препятствует появление в новой, хорошо приспособленной популяции клеток h^- новых мутаций h^+ . Поскольку эти новые клетки h^+ не вытесняются при отборе, их доля в популяции будет возрастать до тех пор, пока весь цикл не начнется снова с появления еще лучше приспособленного типа клеток.

Этот процесс можно условно записать следующим образом. Назовем исходные клетки h_0^- и h_0^+ , а первый хорошо приспособленный мутант — h_1^- . В новой популяции h_1^- произойдут мутации h_1^+ . Со временем доля клеток h_0^+ падает и соответственно возрастает число клеток h_1^+ . Цикл повторяется снова и снова. Из клеток h_1^- возникают еще лучше приспособленные клетки h_2^- , которые вытесняют h_1^- и h_1^+ . Убыль клеток h_1^+ компенсируется появлением мутантов h_2^+ . Общую схему мутирования можно записать так:



На левом графике рис. 14.7 показано волнообразное появление и исчезновение очередных мутантов h^+ . На правом графике рис. 14.7 показана относительная стабильность соотношения мутантов h^+ и h^- в популяции, если рассматривать все мутанты h^+ как один класс клеток.

Уровень, которого достигает доля мутантов в популяции, следует назвать *псевдоравновесным*: на самом деле он достигается в результате наложения ряда дискретных, неравновесных событий. При обычных, очень низких скоростях мутирования периодический отбор приводит к достижению именно такого псевдоравновесия, и только если скорости прямого и обратного мутирования необычайно высоки, достигается истинное равновесие (рис. 14.6). В этих случаях доля мутантных клеток возрастает так быстро, что вероятность появления хорошо приспособленных мутантов в мутантной и родительской популяциях одинакова.

Выявить периодический отбор довольно трудно, поскольку тот тип мутанта, который можно обнаружить экспериментально (в описанном случае мутант h^+), не является объектом отбора. Как показывает приведенный выше пример, отбор мутанта одного типа в популяции может препятствовать увеличению доли мутантов любого другого типа.

ОТБОР И АДАПТАЦИЯ

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Обычно вероятность мутирования одного гена при каждом клеточном делении составляет примерно $1 \cdot 10^{-8}$, поэтому, как кажется на первый взгляд, мутации появляются слишком редко, чтобы это имело большое значение. Но предположим, что у нас есть «чистая культура» какой-либо бактерии в виде 10 мл культуры в стационарной фазе. Такая культура содержит 10 млрд. клеток; вполне вероятно, что в отношении каждого гена в культуре содержится несколько тысяч мутантных клеток. Даже за время роста одной колонии бактерий, содержащей от 10^7 до 10^8 клеток, возникает большое число мутантов (рис. 14.8).

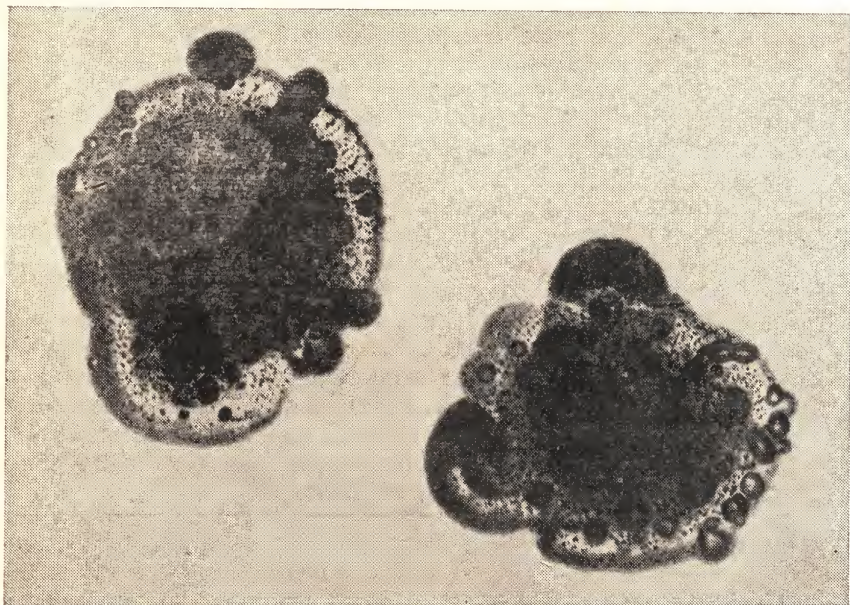
Таким образом, большая популяция бактерий обладает значительной потенциальной изменчивостью, готовой реализоваться в ответ на изменение условий окружающей среды. Благодаря необычайно короткому времени генерации и, следовательно, огромной численности популяций эти гаплоидные организмы обладают скрытой способностью к изменчивости, несмотря на то что они не могут накапливать рецессивные мутации, как это происходит в популяции диплоидных организмов. На практике это означает, что никакая культура

265 бактерий с достаточной плотностью не является генетически

Рис. 14.8. Две колонии бактерий с выростами, которые представляют собой результат вторич-

ного роста мутантов, возникших за время образования основных колоний. (Bryson V., Bryan W., Bacterial genetics, Philadelphia, Saunders, 1953.)

un W., Bacterial genetics, Philadelphia, Saunders, 1953.)



чистой: даже небольшое изменение условий может оказаться фактором отбора и вызвать полное изменение популяции в течение нескольких последовательных пересевов. Этим объясняется, например, почему многие «слабые» патогенные бактерии, которые трудно культивировать сразу после того, как они выделены из хозяев, постепенно становятся все лучше и лучше приспособленными к искусственным условиям.

ДАВЛЕНИЕ ОТБОРА В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

До сих пор мы рассматривали только факторы отбора, действующие в лабораторных культурах. Однако в природе действие отбора проявляется еще сильнее. Например, микроб в почве должен обладать способностью не только выжить при существующих физико-химических условиях, но и выдержать конкуренцию с многочисленными формами микробов, занимающих эту же экологическую нишу. Любая мутация, хотя бы в небольшой степени снижающая способность организма к конкуренции, будет подвергаться давлению отбора и быстро элиминироваться. В естественных условиях приемлемы лишь небольшие вариации в популяции микробов, так как законы конкуренции требуют, чтобы микробы каждого типа облада-

ли набором генов, обеспечивающим максимальную приспособленность.

Как только тот или иной организм выделяют в виде чистой культуры, давление отбора, обусловленное биологической конкуренцией, исчезает. Теперь свойства выделенной популяции, которые в природе остаются постоянными благодаря отбору, могут свободно изменяться. Приспосабливаясь к существованию в лабораторных средах, организмы могут претерпевать генетические изменения, которые не проявились бы в условиях конкуренции с окружающими организмами.

ПОСЛЕДСТВИЯ МУТАЦИЙ В КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛАХ

Часть генома эукариотических организмов локализована в митохондриях и хлоропластах. Органеллы обоих типов содержат и реплицируют ДНК, определяющую некоторые из их фенотипических свойств. Таким образом, свойства хлоропласта или митохондрии контролируются частично ядерными генами, а частично генами органелл, причем и те и другие могут мутировать. Отбирать мутации, специфически затрагивающие ДНК органелл, было весьма сложно, пока не обнаружили, что мутации, сообщающие дрожжам устойчивость к ряду антибиотиков (о которых известно, что они влияют на синтез белка у бактерий), возникают в митохондриальной ДНК. Благодаря этому стало возможно экспериментально изучать передачу многих митохондриальных мутаций. Каждая клетка содержит популяцию митохондрий; следовательно, стабильность таких мутаций во время вегетативного роста определяется относительной скоростью роста нормальных и мутантных митохондрий. Эта ситуация весьма сходна с ситуацией, которая имеет место в растущей популяции бактерий, содержащей два генетически различающихся типа клеток, и результат также может зависеть от факторов окружающей среды.

В хлоропластах одноклеточной водоросли *Chlamydomonas* также были обнаружены мутации. Р. Сэджер (R. Sager) с сотрудниками индуцировали мутации в хлоропластной ДНК, влияющие на способность клеток к фотосинтезу, а также на устойчивость к действию некоторых антибиотиков.

МУТАНТНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

Помимо условно-летальных мутаций, описанных выше, в фагах могут происходить мутации, вызывающие нелетальные изменения фенотипа. Легче всего наблюдать нелетальные изменения, затрагивающие морфологию бляшек и спектр

При посеве фага дикого типа, например T4, на чашку с чувствительным хозяином, например *E. coli* B, в строго контролируемых условиях образуются гомогенные бляшки, обладающие характерными особенностями: они невелики, с неправильными расплывчатыми краями. Но среди большого числа бляшек всегда обнаружится несколько аномальных разновидностей. Если частицы из этих бляшек перенести на другую чашку, то окажется, что аномальный тип бляшек наследуется и, значит, является результатом генетической мутации. В табл. 14.2 перечислено несколько таких мутантных фенотипов.

ТАБЛИЦА 14.2
НЕКОТОРЫЕ МУТАНТНЫЕ РАЗНОВИДНОСТИ Т-ЧЕТНЫХ
БАКТЕРИОФАГОВ¹

Особенность мутанта	Фенотип	Первичное действие мутации
Быстрый лизис	Крупные бляшки с четкими краями	Неизвестно
Малый размер бляшек	Очень мелкие бляшки	Замедление синтеза фаговых частиц или преждевременный лизис хозяйской клетки
Изменение спектра хозяев	Адсорбируется на бактериях, устойчивых к фагу дикого типа	Изменение полипептидов хвостовых нитей
Потребность в кофакторе	Для адсорбции на хозяине нуждается в кофакторе, например в триптофанае	Образование аномальных хвостовых нитей, которые связываются с чехлом; для их освобождения нужен кофактор
Устойчивость к акрифлаину	Образует бляшки на агаре, содержащем акрифлавин в летальной для фага дикого типа концентрации	Снижение проницаемости мембраны клетки-хозяина для акрифлавина
Устойчивость к изменению осмотического давления	Выживает при быстром разведении дистиллированной водой суспензии в 3,0 M NaCl	Изменение в белке головки увеличивает ее проницаемость
Аномалия по лизоциму	Не образует ореола вокруг бляшки	Аномальный синтез лизоцима

¹ Stent G., Molecular biology of bacterial viruses, San-Francisco, Freeman, 1963, с изменениями.

Ранее в настоящей главе мы описали появление устойчивых к фагу мутантов в популяции чувствительных к фагу бактерий. Устойчивость этих мутантов обусловлена образованием измененных поверхностных рецепторов, не способных адсорбировать частицы фага дикого типа; например, клетки

E. coli В могут переходить в состояние, обозначаемое В/2, при котором фаг Т2 не адсорбируется. Но если на газон с клетками В/2 высеять 10^6 или больше частиц Т2, то появляется несколько бляшек. Если теперь выделить и очистить частицы из этих бляшек, то обнаружится, что они являются мутантами по спектру хозяев и могут адсорбироваться и на клетках В/2, и на клетках *E. coli* В. В этом случае мутация представляет собой замену пары оснований в гене, отвечающем за структуру белков хвостовых нитей, органов адсорбции фага Т2. Мутантный фаг обозначают Т2h.

Если посеять на чашки клетки В/2 вместе с мутантным фагом, можно отобрать новый класс мутантных бактерий, устойчивых к фагу Т2h. Теперь можно снова повторить весь цикл: отобрать фаг-мутант по спектру хозяев второго порядка; этот фаг может адсорбироваться на новой устойчивой бактерии. По всей вероятности, для любой измененной конфигурации поверхностного рецептора бактерии можно подобрать соответствующее изменение органа адсорбции фага. В природе способность клетки и вируса мутировать позволяет обоим существовать: в каждый момент имеются как чувствительные клетки-хозяева, доступные для вируса, так и клетки, устойчивые к вирусу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Braun W., 1965, *Bacterial Genetics*, 2nd ed., Philadelphia, Saunders.
Goodenough U., Levine R. P., 1974, *Genetics*, New York, Holt, Rinehart and Winston.
Hayes W., 1968, *The Genetics of Bacteria and Their Viruses*, 2nd ed., Oxford, England, Blackwell. [Имеется перевод 1-го изд.: Хэйс У. Генетика бактерий и бактериофагов. — М.: Мир, 1965.]

Обзоры

- Gots J. S., Benson C. E. (1974), *Biochemical Genetics of Bacteria*, Ann. Rev. Genetics, 8, 77.

Оригинальные работы

- Levinthal M. (1974), *Bacterial Genetics Excluding E. coli*, Ann. Rev. Microbiol., 28, 219.
Luria S., Delbrück M. (1943), *Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance*, Genetics, 28, 491.

15 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

В ходе эволюции естественный отбор действует не столько на уровне мутаций в отдельных генах, сколько на уровне *новых комбинаций генов*, возникающих при соединении в одной клетке мутантных генов из двух разных клеток. Этот процесс называется *генетической рекомбинацией*: в настоящей главе мы рассмотрим механизмы генетической рекомбинации у бактерий, бактериальных вирусов и эукариотических микроорганизмов.

РЕКОМБИНАЦИЯ У БАКТЕРИЙ

На молекулярном уровне рекомбинация представляет собой процесс, в ходе которого из ДНК двух разных родительских клеток образуется рекомбинантная хромосома. В бактериях к образованию рекомбинантных хромосом ведут три процесса (в порядке их обнаружения): *трансформация*, *конъюгация* и *трансдукция*. Они отличаются от полового процесса у эукариот тем, что истинного слияния клеток не происходит; вместо этого часть генетического материала донорной клетки переносится в реципиентную клетку. Таким образом, реципиентная клетка становится диплоидной в отношении лишь части своего генетического материала; такие частичные зиготы называются *мерозиготами*.

Исходный геном реципиента называется *эндогенотой*, а фрагмент ДНК, который вводится в реципиентную клетку, — *экзогенотой*. И происхождение, и размер экзогеноты при этих трех процессах различаются. При трансформации короткие фрагменты двухцепочечной ДНК, высвободившиеся из донорных клеток, адсорбируются на поверхности реципиентных клеток и проникают в них таким образом, что одна цепь деградирует. При трансдукции небольшой двухцепочечный фрагмент ДНК переносится из донорной клетки в реципиентную частицей бактериофага: в некоторых случаях он прикреплен к фаговой ДНК. При конъюгации из одной клетки в другую переносится одна цепь ДНК, причем клетки находятся в непосредственном контакте, а переносимая ДНК может составлять значительную часть донорного генома.

Прежде чем подробно рассматривать эти три процесса, остановимся на некоторых их общих свойствах.

СУДЬБА ЭКЗОГЕНОТЫ

270 Если экзогенота содержит участок, гомологичный какому-либо участку эндогеноты, то происходит спаривание и сразу же

образуется рекомбинантная хромосома путем интеграции части или всей экзогеноты с эндогенотой.

Если спаривание и интеграция по каким-либо причинам невозможны, судьба экзогеноты может пойти по одному из следующих путей. Если экзогенота содержит генетические элементы, необходимые для ее репликации, она может сохраниться и реплицироваться, в результате чего мерозигота даст начало клону частично диплоидных клеток. Это явление имеет место в некоторых особых случаях трансдукции и конъюгации (см. ниже). Если экзогенота не содержит таких элементов, она может сохраниться, но не реплицироваться, так что в клоне клеток, возникших из мерозиготы, частичным диплоидом будет всегда лишь одна клетка. Это явление, которое наблюдается только при трансдукции, называется *абортивной трансдукцией*.

Наконец, экзогенота может деградировать под действием ферментов; это явление носит название *ограничение хозяином* (рестрикция).

РЕСТРИКЦИЯ И МОДИФИКАЦИЯ ДНК

Деградация чужеродной ДНК, проникшей в бактериальную клетку, была впервые открыта при заражении бактериофагами. Это явление удобно рассмотреть до того, как мы перейдем к обсуждению вопроса о роли рестрикции в рекомбинации у бактерий.

В ранних работах о бактериофагах не раз упоминалось о так называемой «модификации бактериальных вирусов хозяином». Отмечалось, что после посева фага на одном штамме бактерии-хозяина эффективность заражения другого штамма резко падала. В табл. 15.1 приведен пример такого экспери-

ТАБЛИЦА 15.1

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЗАРАЖЕНИЯ БАКТЕРИОФАГАМИ ПРИ ПОСЕВЕ НА ЧАШКИ С РАЗЛИЧНЫМИ ХОЗЯЕВАМИ¹

Хозяева, на которых фаг был выращен	Эффективность заражения при посеве на чашки	
	<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> B
<i>E. coli</i> K12	1,0	$1 \cdot 10^{-4}$
<i>E. coli</i> B	$4 \cdot 10^{-4}$	1,0

¹ Arber W., Dussoix D., Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage λ , J. Mol. Biol., 5, 18 (1962), с изменениями.

мента: частицы фага λ , образовавшиеся в клетках *Escherichia coli* K12, заражают этот штамм с эффективностью¹ 1,0; эф-

¹ Эффективность заражения, равная 1,0, означает, что каждая частица вызывает продуктивную инфекцию и, следовательно, образует бляшку. Эффективность заражения $1 \cdot 10^{-4}$ означает, что продуктивную инфекцию в хозяйских клетках вызывает лишь одна частица из 10^4 .

фективность же заражения *E. coli* В составляет $1 \cdot 10^{-4}$. Опыты с фаговыми частицами, образовавшимися в клетках штамма В, показывают, что они обладают обратными свойствами: эффективность заражения штамма В равна 1,0, а штамма К12 — только $4 \cdot 10^{-4}$. Другими словами, фаговые частицы могут успешно заражать хозяйские клетки только того типа, в которых образовалась их ДНК. Если ДНК фага «чужеродна» для клетки-хозяина, примерно в 99,9% клеток продуктивная инфекция не возникает.

Неспособность «чужеродного» фага продуктивно заражать бактерию-хозяина обусловлена действием специфической эндонуклеазы, расщепляющей чужеродную ДНК; если клетки чужеродного хозяина инфицировать фагом, ДНК которого мечена по ^{32}P , то очень скоро можно будет обнаружить мелкие меченые фрагменты фаговой ДНК.

Это явление и называется *рестрикцией*, а эндонуклеаза — *ферментом рестрикции*. Все вышесказанное позволяло сделать вывод, что фаговая ДНК, образовавшаяся в хозяйских клетках данного типа, уже не служит субстратом для фермента рестрикции; иными словами, она ферментативно модифицируется в хозяине таким образом, что в дальнейшем оказывается защищенной от рестрикции.

Возвращаясь к табл. 15.1, можно рассмотреть приведенные в ней данные в свете представлений о рестрикции и модификации. Фаг, выращенный на штамме К12 (мы будем называть его λK), специфически модифицируется, так что фермент рестрикции данного штамма уже не может расщепить его ДНК. Однако ДНК фага λK является хорошим субстратом для фермента рестрикции штамма В и легко расщепляется в клетках этого штамма. Тем не менее в одной из 10^4 клеток фаг вырастает, так как модифицируется клеткой *E. coli* В до начала деградации ДНК. В фаговых частицах, вышедших из этой клетки, ДНК модифицирована по типу В; эти частицы (которые мы назовем λB) становятся устойчивыми к действию фермента рестрикции штамма В, но быстро расщепляются ферментом рестрикции штамма К12.

Процесс модификации состоит в метилировании оснований в небольшом числе весьма специфичных участков ДНК, которые одновременно являются местами расщепления ферментом рестрикции. ДНК бактериальной хромосомы модифицируется таким же образом, поскольку в противном случае хромосома расщеплялась бы системой ферментов рестрикции. Рестрикция и модификация играют роль и в переносе бактериальной ДНК из одной клетки в другую при рекомбинации. Например, клетки *E. coli* В конъюгируют с клетками *E. coli* К12, но число образующихся рекомбинантов составляет одну тысячную от числа рекомбинантов при подобных скрещиваниях между двумя штаммами — производными от *E. coli* В или двумя штаммами — производными от *E. coli* К12.

Гены, ответственные за образование ферментов рестрикции и модификации, тесно сцеплены в бактериальной хромосоме. С помощью рекомбинации удалось получить штамм K12, который несет аллели генов рестрикции и модификации штамма В; этот штамм K12 рекомбинирует со штаммом В *E. coli* с высокой эффективностью.

Существование и специфичность ферментов рестрикции и модификации определяют сложность картины совместимости различных штаммов бактерий в отношении способности ДНК одного штамма избежать деградации в клетках другого. Эта картина усложняется еще и тем, что некоторые фаговые геномы, а также отдельные плазмиды¹ сами обладают генами рестрикции и модификации. Поэтому производный от *E. coli* K12 штамм, лизогенный по фагу P1, является плохим реципиентом при рекомбинации с нелизогенными донорными штаммами K12.

ИНТЕГРАЦИЯ ЭКЗОГЕНОТЫ С ЭНДОГЕНОТОЙ

В опытах с ДНК, меченной тяжелыми изотопами, было установлено, что рекомбинация между экзогенотой и эндогенотой происходит путем *разрыва и воссоединения* родительских молекул ДНК. Самое удивительное свойство процесса рекомбинации, делающее ее вообще возможной, — это *сохранение последовательности пар оснований*. Кроме тех сайтов, где произошли мутации, рекомбинантная ДНК имеет такую же последовательность пар оснований, как и родительские молекулы. Предполагается, что механизм, обеспечивающий точную ориентацию родительских молекул, основан на комплементарном спаривании одноцепочечных участков ДНК. Рекомбинация между фрагментами ДНК может происходить, например, так, как это показано на рис. 15.1. Комплементарные цепи двух фрагментов, содержащих одинаковые последовательности пар оснований, спариваются друг с другом, в результате чего противоположные цепи в каждом фрагменте вытесняются из дуплекса, переходят в неспаренное состояние, а затем расщепляются клеточной экзонуклеазой. ДНК-полимераза восстанавливает недостающий сегмент, и процесс завершается соединением концов цепей с помощью полинуклеотидлигазы.

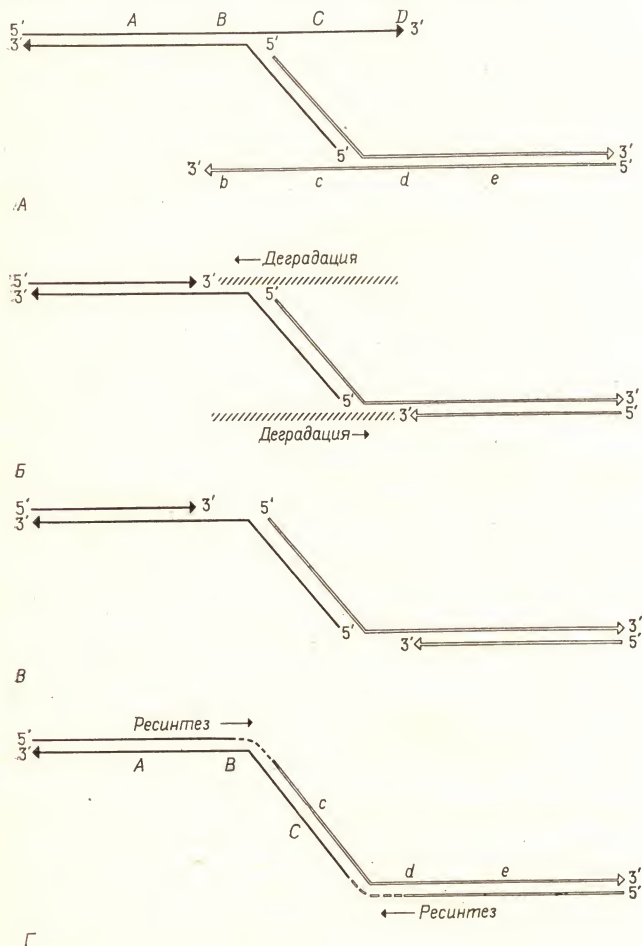
Сходство этого процесса с процессом репарации ДНК (рис. 13.11) поразительно. Ферменты деградации, синтеза и воссоединения цепей, осуществляющие репарацию ДНК, по всей вероятности, участвуют также и в рекомбинации.

Если рекомбинация происходит не на концах молекул ДНК, процесс выглядит сложнее. Предполагается, что и в

Рис. 15.1. Гипотетический механизм рекомбинации между фрагментами ДНК с совпадающей последовательностью пар оснований. А. Одна из цепей первого фрагмента образует водородные связи с комплементарной цепью друго-

гой молекулы. Б, В. Свободные односторонние участки постепенно разрушаются экзонуклеазой. Г. С помощью ДНК-полимеразы синтезируются недостающие участки (пунктир), а затем полинуклеотидлигаза соединяет концы цепей;

образуется рекомбинантная молекула. (Отметим, что эта молекула гетерозиготна по маркеру С. После следующего цикла репликации генотип одной дочерней молекулы будет ABCde, а другой — ABcde.)

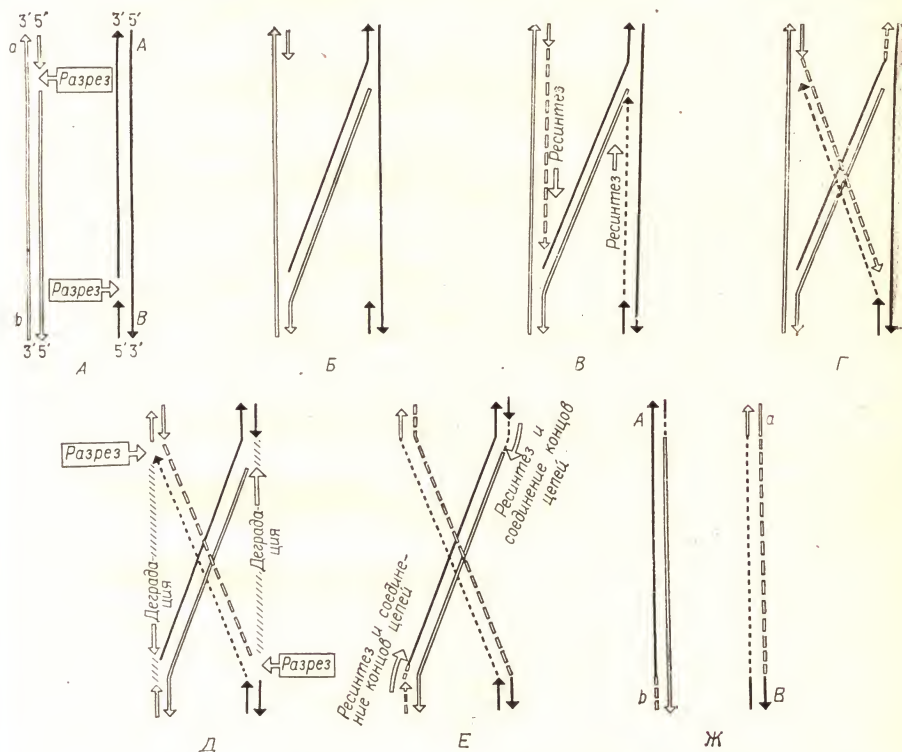


этом случае одноцепочечный участок одного родительского дуплекса вытесняет гомологичный участок цепи другого дуплекса, однако точная последовательность событий пока неизвестна. Один из возможных вариантов представлен на рис. 15.2. Каким бы ни был точный механизм этого процесса,

Рис. 15.2. Гипотетический механизм рекомбинации между молекулами ДНК. А. Одна из родительских молекул несет маркеры АВ, другая — аb. Однонитевые разрывы в родительских молекулах расположены в разных местах между маркерами А и В. Б. Родительские дуплексы частично разошлись, и ос-

нования одной из цепей первой молекулы образуют водородные связи с комплементарными основаниями другой молекулы. В. На одноцепочечном участке каждой родительской молекулы происходит ресинтез второй цепи. Г. Новосинтезированные цепи спариваются друг с другом. Д. Эндонуклеаза делает

однонитевой разрез в каждом родительском дуплексе, и «лишние» участки ДНК с 3'-концов постепенно разрушаются экзонуклеазой. Е, Ж. Соединение концов цепей приводит к образованию двух рекомбинантных молекул, Ab и aB. (По схеме Уайтхауса.)



в основе его должна лежать рекомбинация, которая имеет место как при кроссинговере у эукариот, так и при интеграции двух разных репликонов¹ у бактерий.

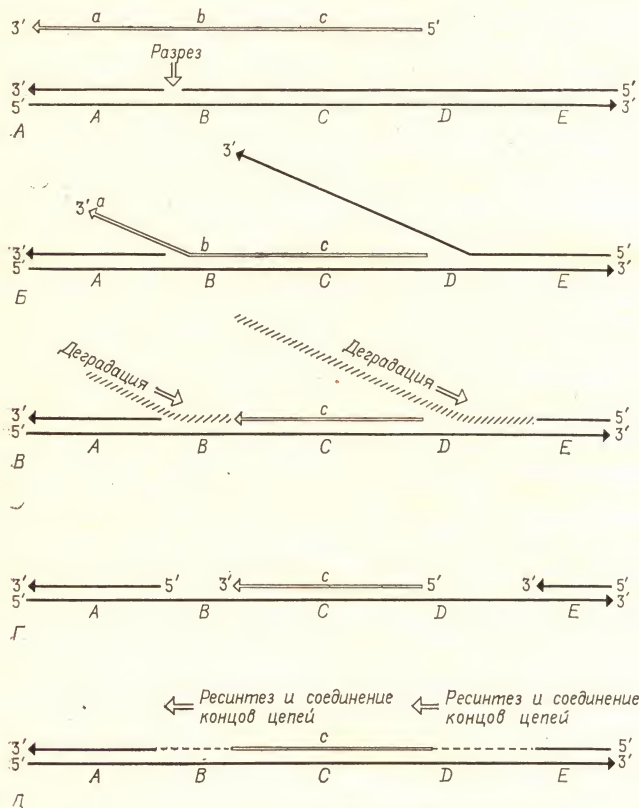
При трансформации, а также при переносе коротких фрагментов ДНК в процессе конъюгации дело обстоит несколько иначе. В этих случаях эксперименты с изотопной меткой показали, что с двухцепочечной эндогенотой интегрируется

¹ Репликон — единица репликации. Интеграция двух репликонов происходит в том случае, когда такие плазмиды, как F-фактор или умеренный фаг λ, интегрируются с бактериальной хромосомой.

Рис. 15.3. Интеграция одноцепочечной экзогеноты с двухцепочечной эндогенотой. А. Одноцепочечный фрагмент, несущий маркеры *abc*, располагается вблизи двухцепочечной молекулы, несущей маркеры *ABCDE*. Между марке-

рами *A* и *B* имеется односторонний разрыв. Б. Частичное расхождение цепей дуплекса позволяет экзогеноте и эндогеноте образовать водородные связи. В, Г. Экзонуклеаза разрушает одноцепочечные участки с 3'-концов. Д. С помощью

ДНК-полимеразы восстанавливаются недостающие участки, затем концы цепей соединяются полинуклеотидлигазой; образуется рекомбинантная молекула, в которой одна из цепей несет маркеры *ABCDE*.



только одна цепь экзогеноты. На рис. 15.3 показан возможный механизм этого процесса. Какие фрагменты экзогеноты — одно- или двухцепочечные — участвуют в интеграции в случае переноса длинных фрагментов хромосомной ДНК путем конъюгации или при трансдукции, осуществляемой фагами, до сих пор неясно.

СЕГРЕГАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ КЛЕТКИ

Бактерия содержит несколько хромосом, но в процессе рекомбинации может участвовать только одна хромосома реципиентной клетки. После интеграции экзогеноты клетка с не-

сколькими хромосомами становится гетерокарионом; для образования гомокариотного рекомбинанта необходим такой же процесс *сегрегации хромосом*, какой был описан раньше при образовании гомокариотного мутанта (рис. 14.3).

ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ

ОТКРЫТИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ

Трансформация была обнаружена впервые у пневмококков (*Streptococcus pneumoniae*). Пневмококки, содержащиеся в мокроте или в тканях больных пневмонией, всегда имеют отчетливо выраженную полисахаридную капсулу; на чашках с агаром инкапсулированные клетки (S-клетки) образуют гладкие колонии. На основании химических различий в полисахаридах капсулы пневмококки можно разделить на множество различных типов. Эти типы (которые обозначают I, II, III и т. д.) удается различить иммунологически.

Если штамм S многократно пересеивается, в популяции появляются клетки R-типа (образующие шероховатые колонии), не имеющие капсул и авирулентные. В 1928 г. Ф. Гриффит (F. Griffith) обнаружил, что если ввести мыши подкожно очень большое количество R-клеток вместе с убитыми нагреванием S-клетками типа II, то через несколько дней мышь погибнет. В крови животного обнаруживаются только гладкие клетки типа II. Следовательно, из мертвых клеток типа II выделилось что-то такое, что сообщило живым R-клеткам способность образовывать капсулярный полисахарид иного типа. Оказалось, что это перенесенное свойство наследуется.

Через несколько лет другим исследователям удалось провести такую же *трансформацию типа клеток*, смешивая *in vitro* R-клетки с убитыми нагреванием S-клетками. Позднее было обнаружено, что трансформация типа клеток может происходить и под действием бесклеточных экстрактов S-клеток. Другими словами, когда некое химическое вещество, экстрагированное из S-клеток типа II, добавляют к культуре R-клеток типа I, некоторые клетки генетически изменяются (трансформируются) и переходят в группу типа II.

Неидентифицированное химическое соединение, вызывающее это явление, было названо *трансформирующим началом*. Оно обладает двумя свойствами, обычно характерными только для генов: во-первых, способностью к самоудвоению (можно получить экстракт трансформированной культуры, содержащий гораздо больше трансформирующего начала, чем было использовано первоначально для трансформации); во-вторых, способностью определять специфическую функцию клетки —

ПРИРОДА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО НАЧАЛА

В 1944 г. О. Эвери (O. Avery), К. Мак-Леоду (K. MacLeod) и М. Мак-Карту (M. McCarty) удалось очистить трансформирующее начало пневмококка и показать, что оно представляет собой ДНК. До того времени считалось, что специфичность гена определяется белковым компонентом нуклеопротеида; химическая характеристика трансформирующего начала была первым прямым доказательством, что ДНК является носителем генетической информации.

После 1944 г. подобного типа трансформация была проведена с бактериями, относящимися к другим родам, в частности с *Haemophilus*, *Neisseria* и *Bacillus*. Трансформацию штаммов *E. coli* K12 удалось осуществить только после многих неудачных попыток. Способность этого вида к трансформации, как оказалось, зависит от присутствия ионов кальция в высокой концентрации и сильно увеличивается при использовании мутантных линий, которые лишены некоторых дезоксирибонуклеаз.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Все мутантные локусы (или маркеры) реципиентных клеток могут быть трансформированы. Однако переносимый фрагмент генетического материала обычно очень мал; хотя такой фрагмент может содержать много генов, он редко несет более одного генетического маркера. Это обусловлено особенностями метода, который обычно применяют для получения трансформирующей ДНК. Обработка препарата фенолом для удаления белков и многократное переосаждение этанолом приводит к гидродинамической деградации ДНК на фрагменты, мол. вес которых даже в препаратах, приготовленных с максимальными предосторожностями, редко превышает $1 \cdot 10^7$. Такой фрагмент соответствует примерно 0,3% бактериальной хромосомы, или примерно 15 генам¹. Однако в опытах по трансформации клеток отдельных видов использовалось не более нескольких десятков мутантных локусов, так что вероятность присутствия двух маркеров в одном фрагменте ДНК была очень низкой. И тем не менее такая «сцепленная трансформация» иногда наблюдалась.

Если использовать плохо очищенные препараты трансформирующей ДНК, при получении которых гидродинамическая и ферментативная деградация сведена к минимуму, удастся получить сцепленную трансформацию по многим маркерам.

¹ Средний размер гена составляет, по оценкам, 1000 пар оснований, кодирующих полипептид длиной около 330 аминокислотных остатков. Бактериальная хромосома содержит около $1 \cdot 10^6$ пар оснований ДНК, что соответствует 5000 генов среднего размера.

В таких препаратах может переноситься до одной трети хромосомы.

Рекомбинация обычно происходит с относительно низкой частотой, поэтому приходится использовать *селективные маркеры*, т. е. донорная ДНК должна содержать маркеры, позволяющие отобрать рекомбинанты при наличии в популяции большого избытка живых родительских реципиентных клеток. Подходящими селективными маркерами могут быть устойчивость к лекарственным препаратам и способность расти в отсутствие определенных питательных веществ. Если, например, реципиентная культура чувствительна к стрептомицину, а донорная устойчива, то трансформацию всего нескольких клеток можно обнаружить путем посева культуры, обработанной препаратом ДНК, на чашки с агаром, содержащим стрептомицин. В этом случае мутантный локус, ответственный за устойчивость, является селективным маркером. Точно так же, если реципиентная культура ауксотрофна (например, для ее роста необходим аргинин), а донорная культура не зависит от аргинина, то трансформацию можно обнаружить при посеве популяции клеток, обработанной ДНК, на чашки с агаром без аргинина.

Для выращивания культур *Streptococcus*, *Hemophilus* и *Neisseria* необходимы сложные среды, поэтому работать с маркерами ауксотрофности в случае этих организмов трудно. В то же время бактерия *Bacillus subtilis* растет на простых минеральных средах, содержащих подходящий источник углерода, и получено много различных ауксотрофных мутантов этого организма. Трансформацию ауксотрофа легко обнаружить, если использовать ДНК из штамма дикого типа и высеять обработанные ауксотрофные реципиентные клетки на минимальную среду (содержащую минимальное число питательных веществ, достаточных для поддержания роста организма дикого типа).

ПРОЦЕСС ТРАНСФОРМАЦИИ

При образовании трансформантов ограничивающим фактором является обычно *компетентность* популяции реципиентных клеток, их способность поглощать трансформирующую ДНК.

Физиологическое состояние клетки, определяющее ее компетентность, сильно меняется на протяжении клеточного цикла. Природа компетентности остается недостаточно ясной; известно, что компетентные клетки синтезируют какой-то белок, который удастся выделить и использовать для придания компетентности другим клеткам. Возможно, этот белок — компонент мембраны, катализирующий поглощение ДНК, или фермент, расщепляющий какие-то компоненты клеточной поверхности и обнажающий рецепторные участки, с которыми связывается ДНК. Компетентность клеток, видимо, зависит от синтеза этого белка, так как в присутствии веществ, подав-

ляющих синтез белка, например хлорамфеникола, компетентность не развивается.

Поглощение ДНК было детально исследовано в опытах с грамположительными пневмококками. Выявлено три стадии этого процесса. На первой стадии двухцепочечная ДНК связывается с участками, которые имеются (или доступны) на поверхности только компетентных клеток. В связывании ДНК важную роль играет процесс постоянного включения холина в мембранные фосфолипиды. Включение холина происходит в экваториальной области клетки — месте образования новой клеточной стенки, и, по всей вероятности, ДНК проникает в клетку только через эту область. Клетки пневмококков неспецифичны в отношении типа поглощаемой ДНК: например, ДНК из тимуса телят они поглощают так же эффективно, как и гомологичную ДНК. Но если экзогенота и эндогенота не имеют достаточной гомологии в последовательностях пар оснований, чтобы обеспечить спаривание, то рекомбинанты не образуются.

На второй стадии связанная с наружной поверхностью ДНК ферментативно расщепляется в местах, расположенных случайным образом, с образованием фрагментов со средним мол. весом $4-5 \cdot 10^6$. На последней стадии, требующей затраты энергии, фрагменты ДНК проникают в клетку. Эта стадия сопровождается деградацией одной из цепей дуплекса ДНК и образованием внутриклеточного одноцепочечного интермедиата. Фрагменты с мол. весом менее $5 \cdot 10^5$ не поглощаются.

В мутантном штамме пневмококка, лишенном двух основных дезоксирибонуклеаз, была обнаружена остаточная активность третьей, минорной нуклеазы. Из этого штамма были выделены мутанты, дефектные по способности к трансформации. Некоторые из таких мутантов утратили остаточную нуклеазную активность. Они способны нормально связывать ДНК, но не могут расщеплять и поглощать ее. Следовательно, минорная дезоксирибонуклеаза, видимо, необходима для первых этапов трансформации — поглощения ДНК и деградации одной из цепей.

Процесс поглощения ДНК изучали также на грамотрицательной бактерии *Hemophilus influenzae*. Хотя у этого организма трансформация в общих чертах напоминает трансформацию у грамположительных пневмококков, имеются и некоторые существенные отличия. Одно из них — специфичность процесса: *Hemophilus* поглощает только гомологичную ДНК. Другое отличие относится к стадии проникновения ДНК в клетку: превращение в одноцепочечную молекулу, видимо, идет параллельно интеграции, поскольку свободный одноцепочечный интермедиат не обнаруживается.

У клеток *Hemophilus*, как и у пневмококков, компетентность циклически изменяется. Недавно было обнаружено, что в развитии компетентности какую-то роль играет цикличе-

ский АМФ: добавление этого нуклеотида в среду может увеличить компетентность в популяции клеток в 10 000 раз!

Выше мы уже обсуждали интеграцию трансформирующей ДНК с эндогенотой. Интеграция происходит очень быстро; сразу после поглощения трансформирующей ДНК, несущей сцепленные маркеры A^+B^- , клетками с генотипом A^-B^+ можно выделить из клеток фрагменты ДНК, несущие маркеры A^+B^+ ¹. Это показано в опытах по выявлению в экстрактах реципиентов ДНК, которая может «котрансформировать» реципиент A^-B^- и давать клетки с генотипом A^+B^+ ; образование ДНК с маркерами A^+B^+ начинается почти без всякой задержки и линейно возрастает со временем, достигая полумаксимального уровня через 5 мин. Этот процесс протекает при полном отсутствии репликации ДНК.

ПРОЦЕСС ТРАНСФОРМАЦИИ В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ

Для проведения трансформации в лабораторных условиях необходимо выделить донорную ДНК. Однако почти сразу после открытия рекомбинации были высказаны предположения, что в природе у бактерий этот процесс может происходить при трансформации. Чтобы проверить эту гипотезу, смешанные культуры генетически маркированных пневмококков получали в таких условиях, когда многие клетки лизируются. Как и предполагалось, в результате высвобождения ДНК из некоторых клеток и ее поглощения другими клетками происходило образование рекомбинантов. Поскольку рекомбинация значительно увеличивает число наборов генов, с которыми оперирует естественный отбор, рекомбинация в природе, даже если она происходит редко, должна играть очень важную роль в эволюции бактерий.

КОНЬЮГАЦИЯ БАКТЕРИЙ

Открытие трансформации впервые продемонстрировало существование рекомбинации у бактерий. Как только была установлена способность бактерий к трансформации, начались поиски процессов генетической рекомбинации, которые в большей степени, чем трансформация, напоминали бы половое размножение у эукариот. В 1946 г. Дж. Ледерберг (J. Lederberg) и Э. Татум (E. Tatum) провели серию опытов на *E. coli* с целью выявления рекомбинации при конъюгации.

Клетки *E. coli* не нуждаются в факторах роста. С помощью мутагенеза Ледерберг и Татум получили два ауксотрофных штамма *E. coli* K12, несущих мутации в четырех генах, детерминирующих ферменты биосинтеза. Каждая мута-

¹ А и В — это два сцепленных маркера; знак «+» обозначает аллель дикого типа, а «—» — мутантный аллель.

ция обуславливала потребность в одном факторе роста: один штамм нуждался в биотине и метионине, другой — в треонине и лейцине. Локусы, в которых произошли мутации, были обозначены соответственно *bio*, *met*, *thr* и *leu*. Итак, два родительских генотипа можно частично описать следующим образом:

Родительский генотип I	<i>bio</i> ⁻	<i>met</i> ⁻	<i>thr</i> ⁺	<i>leu</i> ⁺
Родительский генотип II	<i>bio</i> ⁺	<i>met</i> ⁺	<i>thr</i> ⁻	<i>leu</i> ⁻

Знак «+» в описании генотипа указывает на то, что ген действует, т. е. является аллелем дикого типа. Знак «-» означает, что ген присутствует в виде мутантного аллеля и продуцирует неактивный фермент (в этих случаях соответствующий путь биосинтеза блокируется).

Примерно 10⁸ клеток каждого типа смешали вместе и выселили на минимальную среду, не содержащую никаких факторов роста. Хотя на такой среде не должны были бы расти никакие ауксотрофные клетки, образовалось несколько сотен колоний. Их генотип оказался следующим: *bio*⁺ *met*⁺ *thr*⁺ *leu*⁺ (т. е. это клетки, обладающие наследуемой способностью синтезировать все четыре фактора роста). Основной задачей было выяснить, не участвует ли в этом процессе та или иная разновидность трансформирующего начала. Были испробованы всевозможные подходы, чтобы найти диффундирующее химическое вещество, способное переходить от одной клетки к другой и сообщать ей наблюдаемые генетические изменения, но все попытки такого рода оставались безуспешными. Наконец, с помощью микроскопии было установлено, что для рекомбинации у *E. coli* необходим непосредственный контакт между клетками, их *конъюгация*.

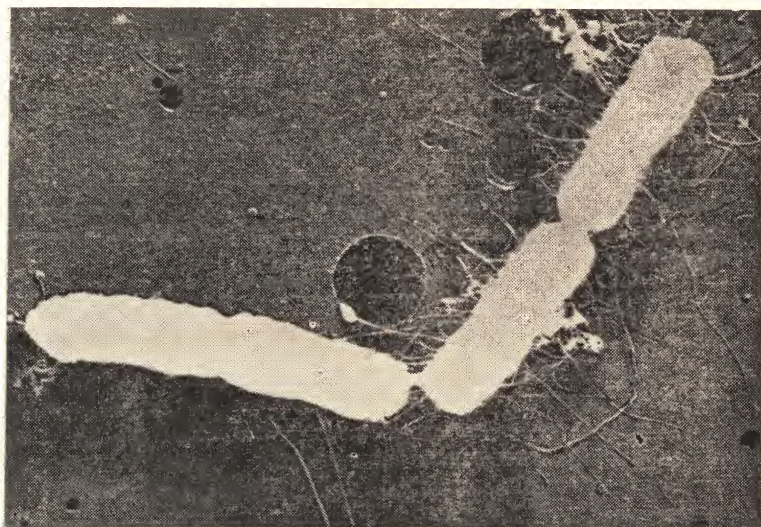
РОЛЬ ПЛАЗМИД В КОНЬЮГАЦИИ БАКТЕРИЙ

Вначале считалось, что при конъюгации бактерий происходит слияние клеток и образование истинной зиготы. Но позднее обнаружили, что у *E. coli* существует разделение на два половых типа и что во время конъюгации *один из партнеров действует только как генетический донор и соответствует мужскому полу, а другой — как генетический реципиент и соответствует женскому полу*. Клетки мужского пола легко распознать, так как их можно убить стрептомицином или другими агентами, но фертильность их все-таки сохранится, тогда как клетки женского пола при обработке летальными агентами теряют фертильность. Другими словами, поскольку главная функция клеток мужского типа — перенос части своей ДНК, они не обязаны сохранять жизнеспособность, в то время как для женских клеток это необходимо: только тогда зигота сможет развиваться. Пара конъюгирующих клеток изображена на рис. 15.4.

Рис. 15.4. Конъюгация клеток *E. coli* ($\times 25\ 600$). Эта электронная микрофотография была сделана вскоре после смешивания донорных (Hfr) и реципиентных (F⁻) клеток. Перед смешиванием клетки «пометили» путем адсорбции инактивиро-

ванных частиц бактериофага: F⁻-клетки легко узнать, так как они густо покрыты пилями. На микрофотографии ясно виден мостик, который образовался между Hfr-клеткой и одной из F⁻-клеток при конъюгации. Обратите внимание на частицы бактериофа-

га, прикрепленные хвостовыми отростками к поверхности клетки Hfr. [Anderson T. F., Wollman E. L., Jacob F., Sur les processus de conjugation et de recombination chez *E. coli*. III. Aspects morphologiques en microscopie electronique, Ann. Inst. Pasteur, 93, 450 (1957).]



При выяснении вопроса о том, к какому половому типу относятся рекомбинанты, образовавшиеся при различных скрещиваниях, оказалось, что *пол у бактерий определяется трансмиссибельным генетическим элементом*: если конъюгируют мужская и женская бактерии, то женская клетка всегда становится мужской. Генетический элемент, ответственный за наследуемость мужского пола, называется *F-фактором* (от слова плодовитость, или фертильность, — fertility); он передается только при непосредственном контакте между клетками.

F-фактор переносится каждой конъюгирующей клеткой, перенос же хромосомных маркеров является довольно редким случайным событием. Следовательно, F-фактор — это автономный элемент, не связанный с бактериальной хромосомой. В 1952 г. Ледерберг предложил называть все внехромосомные наследственные детерминанты, примером которых служит фактор F, *плазмидами*. Теперь нам известно, что бакте-

риальные плазмиды — небольшие кольцевые молекулы ДНК, несущие гены, необходимые для собственной репликации. Во многих случаях они несут также гены, сообщающие хозяйской клетке новые свойства, например устойчивость к лекарственным препаратам или способность к образованию токсинов. Наконец, многие плазмиды несут гены, ответственные за процесс конъюгации. К ним относятся гены, определяющие некоторые новые *поверхностные структуры* клетки; когда клетка приходит в соприкосновение с другой бактериальной клеткой, эти структуры участвуют в образовании конъюгационного мостика. Кроме того, к плазмидам относятся гены, продукты которых осуществляют *перенос молекулы плазмидной ДНК* в реципиентную клетку.

Итак, конъюгация — процесс, способность к которому обеспечивается плазмидой и результатом которого является перенос плазмидной ДНК. Перенос бактериальной хромосомы, как мы увидим далее, — вторичный результат переноса плазмиды; в большинстве случаев (или даже всегда) он зависит от интеграции хромосомы с плазмидой в донорной клетке.

ТИПЫ ПЛАЗМИД

После выяснения природы F-фактора было обнаружено, что генами, содержащимися в плазмидах, определяется множество свойств бактерий-хозяев. Большинство плазмид классифицируют на основании тех свойств хозяев, которые привели к обнаружению этих плазмид. Так, существуют *R-факторы* (от слова устойчивость, или резистентность, — *resistance*) и *Col-факторы* (от слова колициногенность — *colicinogeny*) грамположительных бактерий, *пенициллиназные плазмиды* из *Staphilococcus aureus* и *плазмиды деградации* из *Pseudomonas*, *криптические плазмиды* и т. д.

Плазмиды, которые сообщают своим хозяевам способность к переносу хромосомных маркеров, но не обуславливают никаких других легко различимых признаков, были названы *F-факторами*; к этой группе относится F-фактор, обнаруженный первоначально в *E. coli* K12 и обозначенный F1. Однако многие другие плазмиды, в том числе ряд R- и Col-факторов, могут обеспечивать перенос хромосомы, поэтому некоторые авторы для обозначения любой плазмиды, обладающей такой способностью, использовали термин «половой фактор». Термин «половой фактор» используется и в двух других случаях: во-первых, как общее название для всех плазмид, обеспечивающих конъюгацию хозяйской клетки и собственный перенос, независимо от того, переносятся ли при этом хромосомные маркеры, и, во-вторых, для обозначения группы генов плазмиды, продукты которых участвуют в процессе конъюгации.

Плазмиды можно обнаружить как генетическими, так и физическими методами. Генетически присутствие плазмиды обнаруживается в том случае, когда удастся показать, что какой-либо ген или группы генов, ответственных за одно или несколько свойств клетки хозяина, не сцеплены с бактериальной хромосомой, т. е. реплицируются автономно. Обычно вывод о такой автономной репликации делается на основании *независимого переноса* плазмиды и хромосомы при конъюгации, как это происходит в случае фактора F1, или на основании *необратимой элиминации* плазмиды, спонтанной или вызванной нагреванием, акридиновыми красителями или УФ-светом. В обычных условиях необратимую утрату функции гена можно с таким же успехом интерпретировать и как необратимую мутацию в хромосомном гене. Но индукция такой потери упомянутыми выше агентами характерна для плазмид, например F-фактора, природа которого была подробно изучена в экспериментах по переносу генов. Поэтому и в тех случаях, когда переноса не происходит, высокая частота индуцированной элиминации генов считается сильным доводом в пользу присутствия плазмиды. Еще более строгое доказательство — совместная элиминация, которой постоянно подвергается определенная группа генов, а не один ген.

Элиминация плазмид под действием красителей и других агентов обусловлена способностью этих агентов подавлять репликацию плазмиды при таких концентрациях, которые не влияют на хромосому. В результате во время деления клетки возникают свободные от плазмиды сегреганты.

Критерий элиминации предполагает, что плазмиды несут гены, детерминирующие только функции, не являющиеся жизненно важными для клетки, т. е. что они по определению являются *необязательными автономными элементами*. Действительно, если бы плазида несла ген, необходимый, например, для синтеза белка в клетке, то она отличалась бы от бактериальной хромосомы только размером. Такие плазмиды были получены в лаборатории генетическими методами. Клетки, несущие подобные плазмиды, ведут себя во всех отношениях так, как будто их геном состоит из двух хромосом неравной длины.

Плазмиды можно обнаружить и физическими методами. Далее мы опишем один из таких методов, позволяющий обнаруживать и даже выделять плазмиды как особую фракцию ДНК благодаря их небольшому размеру и кольцевой структуре. Присутствие небольшой кольцевой молекулы ДНК и ее исчезновение вместе с маркером — физическое доказательство того, что этот маркер несет именно плазида. Иногда клетки при трансформации плазмидной ДНК приобретают определенный маркер, что прямо указывает на его связь с плазмидой.

СТРУКТУРА МОЛЕКУЛ

Все плазмиды, структура которых известна, представляют собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК. Несколько плазмид (F1 и некоторые R-факторы) из числа тех, размеры которых были определены, имеют мол. вес порядка $5-7 \cdot 10^7$. Одна плазида (один из R-факторов) имеет мол. вес всего $1 \cdot 10^7$, а некоторые криптические плазмиды еще меньше. Поскольку для кодирования среднего полипептида с мол. весом 40 000 необходимо примерно $6 \cdot 10^5$ дальтон ДНК, F1 и другие плазмиды близкого размера содержат до 100 генов.

Плазмиды можно также охарактеризовать по среднему нуклеотидному составу (т. е. процентному содержанию ГЦ- и АТ-пар). Например, было показано, что ДНК F1 содержит два участка с заметно различающимся нуклеотидным составом: один из них составляет 90% длины молекулы и имеет ГЦ-содержание 50%; у остальных 10% молекулы ГЦ-содержание равно 44%.

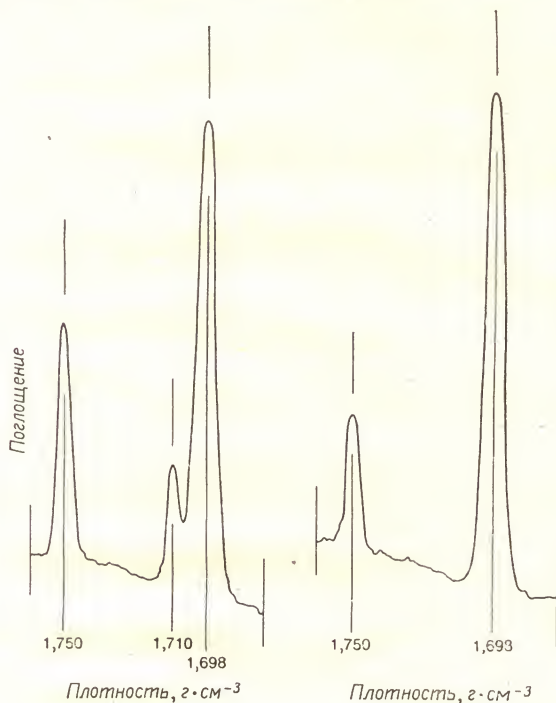
Различия в нуклеотидном составе позволяют разделить разные плазмиды друг от друга или от хромосомной ДНК ультрацентрифугированием в градиенте CsCl, так как плотность ДНК пропорциональна ГЦ-содержанию. Если, например, в бактерии *Proteus mirabilis*, хромосомная ДНК которой характеризуется ГЦ-содержанием 40%, присутствует F1, то при центрифугировании в градиенте CsCl суммарной ДНК, выделенной из бактерии, образуется полоса хромосомной ДНК и «сателлитная» полоса, представляющая собой плазмидную ДНК (рис. 15.5). Однако хромосомная ДНК *E. coli* (ГЦ-содержание 50%) по плотности близка к многим плазмидам, что не позволяет обнаружить их описанным методом.

Другой метод, разработанный позднее, позволяет выявить плазмиды даже в том случае, когда их плотность близка к плотности хромосомы клетки-хозяина. При выделении ДНК из клеток длинные молекулы под действием гидродинамических сил, возникающих при разрушении клеток, перемешивании экстрактов и т. д., неизбежно фрагментируются. Однако когда ДНК присутствует в виде очень маленьких кольцевых молекул, часть этих молекул не разрушается. ДНК, экстрагированная из клеток, содержащих плазмиды, представлена линейными фрагментами и кольцевыми (плазмидными) молекулами. Кольцевые молекулы можно отделить от линейных и очистить с помощью ультрацентрифугирования, затем определить их нуклеотидный состав и молекулярный вес, а с помощью электронной микроскопии — контурную длину и другие структурные особенности (рис. 15.6).

Рис. 15.5. Влияние плазмидной инфекции на состав ДНК *Proteus mirabilis*, штамм РМ-1. Результат микроденситометрирования фотографий, полученных после равновесного ультрацентрифугирования проб в градиенте CsCl . Слева — ДНК, выделенная

из клеток *E. coli* РМ-1, зараженных плазмидой F13; справа — ДНК, выделенная из этого штамма до заражения. Полоса с плотностью $1,750 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$ соответствует стандартному веществу, добавленному в обе пробирки. Полоса с плотностью $1,698 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$

соответствует ДНК *Proteus*, небольшое плечо с плотностью $1,710 \text{ г}\cdot\text{см}^{-3}$ — ДНК F13. [Falkow S. et al., Transfer of episomic elements to *Proteus*. I. Transfer of F-linked chromosomal determinants, J. Bacteriol., 87, 209 (1964).]



Наконец, молекулы ДНК можно охарактеризовать с точки зрения гомологии в последовательности оснований. Если разделить комплементарные цепи дуплекса ДНК нагреванием, а затем медленно охладить смесь, то комплементарные цепи вновь воссоединятся (ренатурируют). Степень воссоединения отдельных цепей разных ДНК зависит от того, насколько они гомологичны: чем длиннее комплементарные друг другу участки, тем большая часть двух цепей ренатурирует. Кроме того, чем ближе друг к другу разные ДНК с точки зрения их эволюционного происхождения, тем ближе их нуклеотидные последовательности; поэтому способность денатурированных нагреванием молекул ДНК из разных источников к ренатурации служит точной мерой генетического родства этих организмов.

Рис. 15.6. Электронные микрофотографии очищенной ДНК Col E1. А. Открытые (релаксированные) и сверхспиральные кольцевые молекулы ДНК, класс 2,3 мкм. Б. Открытая кольцевая молекула

длиной 2,3 мкм рядом со сверхспиральной молекулой. В. Сверхспиральные молекулы (2,3 и 4,7 мкм). Г. Открытые кольцевые молекулы (2,3 и 4,7 мкм). Д. Сверхспиральная кольцевая молекула длиной 4,7 мкм

с большей плотностью витков, полученная с помощью другого метода. [Roth T. F., Helinski D. R., Evidence for circular forms of a bacterial plasmid, Proc. Natl. Acad. Sci., 58, 650 (1967).]



Двухцепочечные молекулы ДНК, образующиеся при ренатурации двух частично комплементарных одиночных цепей, называются *гетеродуплексами*. Генетическая взаимосвязь между многими плазмидами изучалась именно с помощью образования гетеродуплексов; полученные результаты мы обсудим позже.

РЕПЛИКАЦИЯ

Считается, что репликация плазмид в принципе сходна с репликацией хромосом. В обоих случаях кольцевая ДНК прикрепляется к бактериальной мембране в месте репликативной вилки и протягивается через участок прикрепления по мере того, как происходит репликация.

Хотя общие свойства систем репликации хромосомы и плазмиды сходны, имеются и некоторые различия. Например, плазида каждого типа подчиняется, видимо, собственной генетически предопределенной системе *контроля репликации*; скорость репликации плазмиды при определенных условиях может сильно отличаться от скорости репликации хромосомы. Однако при постоянных условиях окружающей среды устанавливается равновесное состояние, и число копий данной плазмиды на клетку остается постоянным. Если, например, F^+ -клетки *E. coli* растут экспоненциально в богатой среде при 37°C, то на каждую хромосому приходится две F-плазмиды. При этих условиях за время каждой клеточной генерации хромосома и плазмиды удваиваются; отсюда следует, что оба типа репликонов регулируются одинаковым образом.

Как уже говорилось выше, репликация многих плазмид весьма чувствительна к некоторым агентам, в частности акридиновым красителям. Например, акридиновый оранжевый препятствует репликации F-фактора в концентрации, слабо влияющей на рост клетки. Поскольку плазмиды — это гораздо меньшие по размеру мишени для неспецифического связывания акридина с ДНК, чем хромосома, такой тип связывания не может обуславливать их исключительную чувствительность; истинная причина повышенной чувствительности плазмид к красителям до сих пор неизвестна. Заметим, что это свойство весьма полезно, так как часто позволяет клеткам «излечиваться» от плазмид.

ИНТЕГРАЦИЯ И РЕКОМБИНАЦИЯ

В гл. 12 было показано, что интеграция профага λ с бактериальной хромосомой происходит в результате одного кроссинговера. Кроссинговер — это акт рекомбинации, которая осуществляется особой ферментативной системой. Интенсивные исследования рекомбинации фага λ позволили обнаружить три разные ферментативные системы рекомбинации в клетках *E. coli*, зараженных фагом λ . 1. Система, определяе-

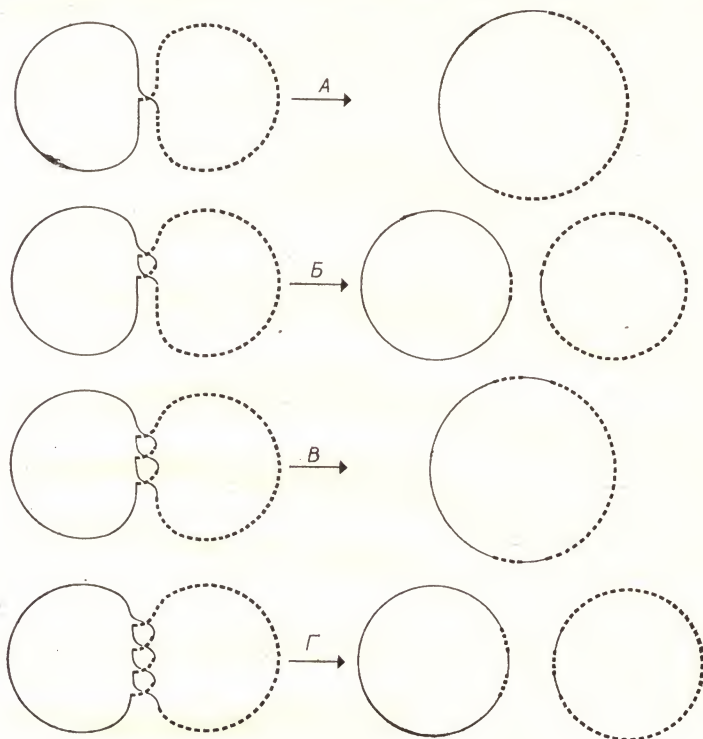
мая генами клетки-хозяина, которая обеспечивает кроссинговер между двумя гомологичными участками хромосомной ДНК или двумя гомологичными участками фага λ ; действие этой системы в клетках, зараженных фагом λ , подавляется. 2. Аналогичная система, определяемая фаговыми генами. 3. Определяемая фаговыми генами ферментативная система интеграции, которая осуществляет кроссинговер между ДНК фага λ и хромосомой *E. coli* в определенных сайтах. Специфичность этой ферментативной системы интеграции, по-видимому, обусловлена ее способностью узнавать определенную последовательность пар оснований в сайтах интеграции, причем эти сайты не гомологичны друг другу.

Способностью к интеграции с хозяйской хромосомой обладает множество разных плазмид; такие плазмиды называются *эписомами*. Как осуществляется такая интеграция — под действием ферментов, подобных интегразе, которая узнает в хромосоме и в плазмиде различные последовательности оснований, или с участием рекомбиназ, действующих только на молекулы, цепи которых комплементарно связываются друг с другом благодаря существованию участков с гомологичной последовательностью оснований, — в большинстве случаев неизвестно. Как бы то ни было, для осуществления интеграции плазмиды в хромосоме бактерии должен существовать подходящий участок; таким образом, способность плазмиды вести себя как эписома определяется *клеткой-хозяином*. Например, фактор F1 в *E. coli* ведет себя как эписома, а в *Proteus mirabilis* — нет. Из исследований по ренатурации ДНК фактора F1 известно, что у нее есть некоторая гомология с хромосомой *E. coli*, но нет никакой гомологии с хромосомой *P. mirabilis*. Неспособность фактора F1 интегрироваться с последней показывает, что в ней нет также специфических сайтов интеграции, которые могла бы узнать интеграза.

После интеграции F-фактора с хозяйской хромосомой второй кроссинговер вблизи первого вызовет исключение и обмен участками ДНК, лежащими между двумя сайтами кроссинговера. Любое нечетное число кроссинговеров приведет к интеграции двух кольцевых ДНК, а любое четное — к обмену участками ДНК (рис. 15.7). Например, F-*lac* — рекомбинантный репликон, возникший в результате двух последовательных кроссинговеров: в результате первого F1 внедрился в участок хромосомы, соседний с *lac*-опероном *E. coli* K12, а в результате второго произошло исключение F-фактора, несущего *lac*-гены.

Ряд колициногенных факторов и R-факторов также могут интегрироваться с хромосомой некоторых клеток-хозяев и, подобно F1, исключаться в результате второго кроссинговера. Эти события, снова и снова повторяющиеся в ходе эволюции, 290 позволяют объяснить гетерогенность ДНК некоторых плазм-

Рис. 15.7. *А* и *В*. Нечетное число кроссинговеров в области спаривания приводит к интеграции. *Б* и *Г*. Четное число кроссинговеров приводит к обмену участками хромосом.



мид и присутствие в большинстве плазмид генов, ответственных за функции хозяйской клетки; хорошей иллюстрацией в пользу этой гипотезы может служить образование таких плазмид, как *F-lac*. Действительно, несколько плазмид, несущих *lac*-гены, встречается в естественных условиях в редких *lac*⁺-штаммах *Proteus*; в норме эти виды являются *lac*⁻.

Нередко кроссинговер происходит и между двумя разными плазмидами; интеграция двух и более плазмид и генетический обмен между сходными плазмидами — обычные явления. Известно, например, что в некоторых хозяевах при определенных условиях многие R-факторы способны разделяться на две или более независимо реплицирующиеся кольцевые молекулы. Между гомологичными плазмидами происходит генетический обмен с четным числом кроссинговеров, и частота этого обмена достаточна для построения генетических карт этих плазмид.

291 Рекомбинантные плазмиды могут также образоваться *in vitro* при ферментативной обработке выделенной плазмидной

ДНК и снова включаться в хозяйские бактерии с помощью трансформации. На первой стадии этого процесса выделенную плазмиду расщепляют в определенном сайте с помощью очищенной рестрикционной эндонуклеазы (например, рестриктазы *Eco RI*). Этот фермент превращает кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК в линейную, расщепляя обе цепи в сайтах, отстоящих друг от друга на 5—6 пар оснований; в результате образуется молекула с короткими одноцепочечными концами, комплементарными друг другу¹.

С помощью того же фермента аналогичным образом расщепляется другая плаزمид. Если теперь смешать эти плазмиды, их одноцепочечные концы спарятся друг с другом и образуют одну кольцевую молекулу ДНК, состоящую наполовину из одной плазмиды, а наполовину из другой. Для ковалентного соединения двух плазмид используется еще один фермент — полинуклеотидлигаза.

Эта методика применяется не только для соединения двух разных плазмид, но и для вставки участка ДНК какого-либо высшего животного в плазмиду. Например, можно выделить, очистить и расщепить с помощью рестриктазы ДНК, кодирующую рибосомную РНК у лягушки *Xenopus*. Если фрагменты так называемой рДНК смешать с плазмидной ДНК, расщепленной тем же ферментом, и затем обработать лигазой, то некоторые из образующихся кольцевых молекул ДНК будут представлять собой плазмиду со вставленными фрагментами, содержащими рДНК лягушки. Если ввести такую рекомбинантную плазмиду в клетку бактерии-хозяина, рДНК реплицируется и транскрибируется как часть плазмиды с образованием рибосомной РНК лягушки (хотя такая РНК и не включается в бактериальные рибосомы). Таким образом, ферментативный синтез и введение в клетку искусственной рекомбинантной плазмиды дает возможность получать большое число копий любой неплазмидной ДНК. Этот метод может оказаться очень полезным для выделения в больших количествах отдельных генов человека и их анализа (например генов, ответственных за наследственные болезни).

ПРОЦЕСС КОНЬЮГАЦИИ

Многие плазмиды грамотрицательных бактерий сообщают хозяйским клеткам способность конъюгировать и переносить молекулу плазмидной ДНК в клетку партнера по конъюгации. Этот процесс протекает в две стадии, и обе они обеспечиваются работой плазмидных генов: 1) взаимодействие между поверхностями донорной и реципиентной клетки, приводя-

292 ¹ ДНК такой структуры совершенно аналогична ДНК вириона фага λ , показанной на рис. 12.17.



Рис. 15.8. Делящаяся клетка *E. coli*, штамм Hfr, у которой видно три типа выростов. Длинные, загнутые, толстые выросты — жгутики. Короткие, тонкие, прямые выросты — обычные пили. Длинный, тонкий отросток (внизу справа), покрытый фаговыми частицами, — F-пиль. (С любезного разрешения Ю. Карнахана и Ч. Бринтона.)

щие к образованию мостика для конъюгации; 2) прохождение молекулы плазмидной ДНК через мостик.

РОЛЬ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ В КОНЪЮГАЦИИ БАКТЕРИЙ

Взаимодействие между донором и реципиентом обусловлено специфическими свойствами поверхности донорной клетки, которые определяются плазмидными генами. Самое поразительное из этих свойств, абсолютно необходимое для конъюгации, — наличие особых выростов, которые называются *половыми пиями*.

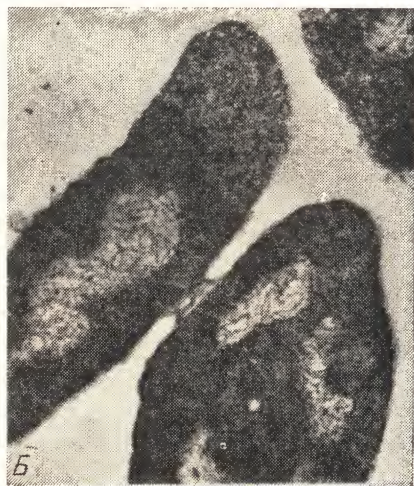
На поверхности клеток, содержащих трансмиссивные плазмиды, имеется очень немного половых пилей (обычно от 1 до 10), так что на каждую копию плазмиды в клетке приходится, по-видимому, всего по одному пилью. Существование пилей было впервые обнаружено, когда электронные микроскописты занялись поисками мест адсорбции некоторых фагов, специфичных к мужским клеткам (такие фаги поражают только бактерии, несущие трансмиссивные плазмиды). Если мужские (донорные) клетки обрабатывали большим избытком частиц такого фага и рассматривали в электронном микроскопе, оказывалось, что фаги адсорбируются исключительно на половых пиях (рис. 15.8).

Специфический рецепторный участок для конъюгации имеется, видимо, и на реципиентной клетке. Этот участок является также специфическим местом адсорбции фага, содержащего одноцепочечную ДНК. Мутантные женские штаммы, устойчивые к этому фагу, не могут адсорбировать их и

Рис. 15.9. А. Мужская и женская клетки, соединенные F-пилем. Единственный F-пиль «помечен» с помощью частиц РНК-содержащего фага, специфичного к мужским клеткам; помимо него мужская клетка имеет и обычные пили,

не адсорбирующие фагов, специфичных к мужским клеткам, и не участвующие в конъюгации. (С любезного разрешения Ю. Карнахана и Ч. Бринтона.) Б. Электронная микрофотография тонкого среза пары клеток в мо-

мент конъюгации; клетки пришли в непосредственное соприкосновение благодаря сокращению F-пиля. [Gross J. D., Caro L. G., DNA transfer in bacterial conjugation, J. Mol. Biol., 16, 289 (1966).]



одновременно дефектны по конъюгации. Дефект затрагивает процесс переноса ДНК, так как при фаговой трансдукции мутанты претерпевают нормальную рекомбинацию.

Первая стадия процесса конъюгации — прикрепление реципиентной клетки к кончику полового пиля (рис. 15.9, А). В течение нескольких минут клетки сближаются и затем вступают в непосредственный контакт (рис. 15.9, Б), возможно, путем сокращения пиля мужской клетки.

Клетки, связанные половым пилем, были выделены с помощью микроманипулятора и исследованы генетическими методами. Некоторые из выделенных таким образом клеток дают рекомбинантные клоны. Это указывает на то, что донорная ДНК может проходить через половой пиль или вдоль него. Но все-таки большая часть генетических переносов происходит только после того, как клетки вступают в непосредственный контакт благодаря сокращению пиля. Переход ДНК внутрь клетки — весьма специфичный процесс, ведь помимо ДНК никакого другого клеточного материала практически не переносится.

ПЕРЕНОС ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Из опытов по включению в ДНК радиоактивных или тяжелых изотопов до или во время переноса вырисовывается следующая общая схема этого процесса.

Перед конъюгацией плазмида существует в донорной клетке в виде двухцепочечной кольцевой молекулы ДНК. Контакт между половым пилем и стенкой реципиентной клетки включает процесс, схематически изображенный на рис. 15.10, А: одна цепь плазмидной ДНК разрывается в месте начала репликации и дуплекс раскручивается; разорванная цепь входит в реципиентную клетку начиная с 5'-конца. В донорной и реципиентной клетках ДНК-полимераза синтезирует комплементарные цепи; таким образом, процесс аналогичен обычной репликации плазмиды с той лишь разницей, что по его завершении одна копия находится в реципиентной клетке, а другая остается в донорной клетке. Переход плазмиды в кольцевую форму в реципиентной клетке происходит под действием полинуклеотидлигазы. Хотя перенос одной цепи дуплекса плазмидной ДНК обычно сопровождается репликацией, для самого процесса переноса такая репликация не обязательна.

Если бактерия несет две плазмиды, одна из которых обеспечивает конъюгацию, а другая нет, то первая может способствовать одновременному переносу последней, т. е. первая плазмида *мобилизует* вторую. Такая мобилизация происходит в том случае, когда плазмида не обеспечивает конъюгации и не содержит генов, ответственных за ряд функций (например, образование пилей), которые может обеспечить конъюгационная плазмида. Мобилизация происходит и в том случае, когда две плазмиды постоянно или временно интегрированы в результате кроссинговера. Бактериальная хромосома также может быть мобилизована путем интеграции с конъюгационной плазмидой (рис. 15.10, Б).

ПЕРЕНОС БАКТЕРИАЛЬНОЙ ХРОМОСОМЫ С УЧАСТИЕМ F-ФАКТОРА

СОСТОЯНИЯ F⁺ и Hfr

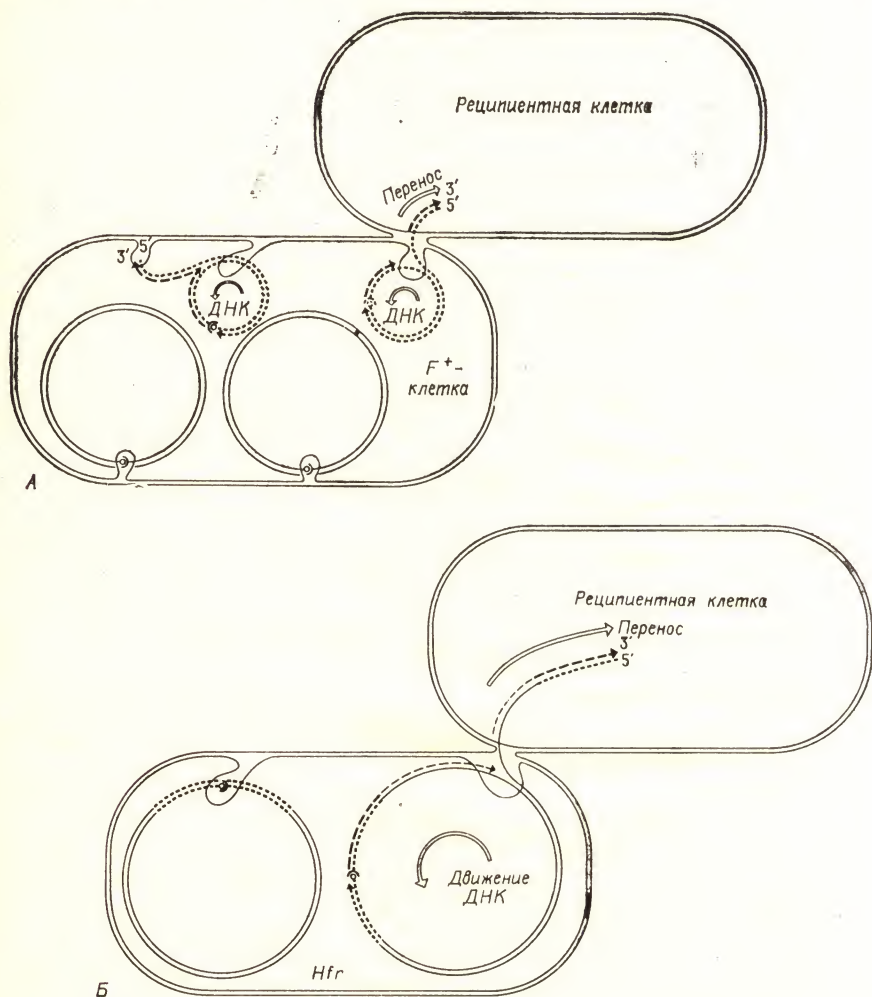
Клетки, несущие F-фактор, обозначают через F⁺, клетки без F-фактора — через F⁻. В популяции F⁺-клеток интеграция F-фактора с хромосомой в результате кроссинговера происходит примерно в одной из 10⁵ клеток в каждом поколении; клетки, в которых произошла интеграция, и образованные ими клоны называются Hfr (от слов high frequency of recombination — высокая частота рекомбинации).

Интеграция не всегда происходит в одном и том же сайте бактериальной хромосомы. Для F1 существует восемь или девять сайтов предпочтительной интеграции; по-видимому,

Рис. 15.10. Гипотетический механизм переноса ДНК вследствие репликации F-фактора. А. Изображена конъюгирующая с реципиентной клеткой F^+ -клетка, которая содержит два автономных F-репликона и две хромосомы. Репли-

кация F-фактора протекает по механизму, описанному на рис. 11.57. Слева: F-фактор реплицируется внутри хозяйской клетки; справа: F-фактор переносится при репликации в реципиентную клетку. Б. Тот же процесс протекает при

конъюгации с участием клетки Hfr , однако в этом случае наблюдается также перенос хромосомной ДНК благодаря ее интеграции с фактором F (сравните с рис. 15.11).



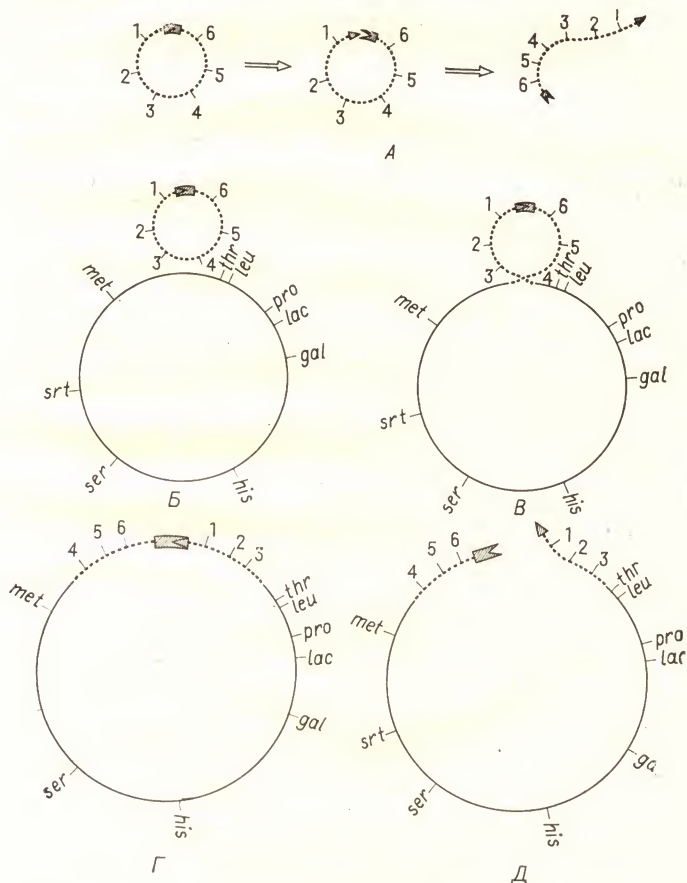
они представляют собой участки, гомологичные соответствующим участкам F1. Кроме того, существует ряд мест, где интеграция F1 происходит существенно реже.

Рис. 15.11. Разрыв и перенос хромосомы в Hfr-штамме при ее интеграции с F-фактором.

А. F-фактор изображен в виде кольца. После специфического расщепления молекулы между маркерами 1 и 6 происходит ее перенос (во время конъюгации), так что маркеры проникают в реципиентную клетку в следующем порядке: 1—2—3—4—5—6. Б. F-фактор спаривается с

участком хромосомы между маркерами *met* и *thr*. В. В результате кроссинговера в месте спаривания происходит соединение колец. Г. То же, что и В, но гибрид изображен в виде одного кольца. Д. После специфического расщепления F-фактора происходит перенос гибрида, в ходе которого в реципиентную клетку проникают сначала маркеры фактора F 1—2—3, затем хромосом-

ные маркеры *thr*, *leu*, *pro*, *lac* и т. д.; маркеры фактора F 4—5—6 проникают последними. Если рекомбинанты получают все 6 маркеров F-фактора, они станут мужскими клетками. Таким образом, чтобы образовался рекомбинант Hfr-типа, необходимо, чтобы был перенесен конец хромосомы с последними маркерами F-фактора.



Процесс интеграции, как мы уже обсуждали выше, обратим. В популяции клеток Hfr исключение F-фактора в результате второго кроссинговера происходит примерно с такой же частотой, как и интеграция в популяции F⁺. Поэтому любая

популяция F^+ содержит небольшое число клеток Hfr , а любая популяция Hfr — клеток F^+ .

ПЕРЕНОС ДНК ДОНОРНЫМИ КЛЕТКАМИ Hfr

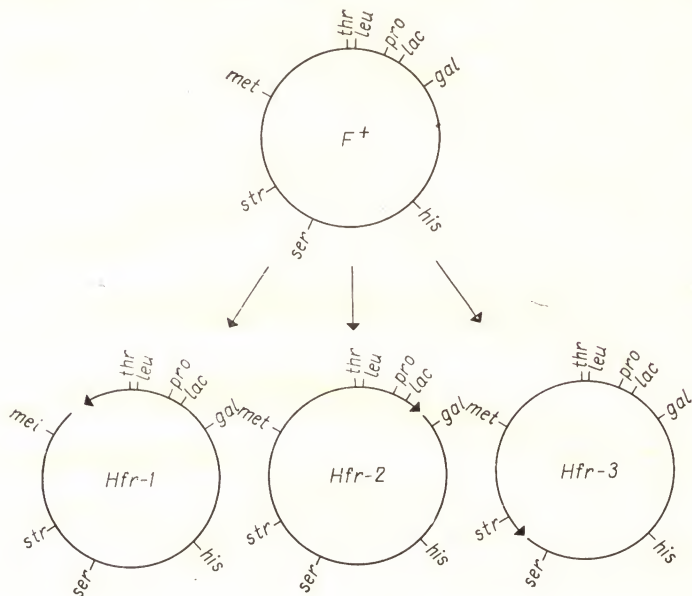
Если суспензию клеток Hfr смешать с избытком клеток F^- , то каждая клетка Hfr прикрепится к одной из F^- -клеток и начнет переносить свою ДНК. Если хромосома и F -фактор интегрировались и стали одним репликоном, хромосомная ДНК вместе с ДНК F -фактора переходит в реципиентную клетку.

Порядок перехода хромосомных маркеров в реципиент зависит от того, в каком месте хромосомы интегрировался F -фактор, а также от полярности интеграции. Например, на рис. 15.11 ориентация F -фактора в месте интеграции такова, что в образовавшейся клетке Hfr хромосомные маркеры будут переноситься в следующем порядке: *thr, leu, pro, lac, ..., met*. Интеграция может происходить также в других местах и характеризоваться противоположной полярностью, приводя к другому порядку переноса маркеров, как показано на рис. 15.12. Полярность интеграции, видимо, определяется гомологичными последовательностями оснований в местах соединения F -фактора и хромосомы.

Линейный перенос хромосомных маркеров Hfr -донорами был открыт Е. Вольманом (E. Wollman) и Ф. Жакобом (F. Jacob) в 1956 г. в ходе изучения кинетики образования рекомбинантов. Эти опыты ставились следующим образом. Через определенные промежутки времени из смеси конъюгирующих клеток Hfr и F^- отбирали пробы и встряхивали их в течение нескольких минут, чтобы разделить пары конъюгировавших клеток. Каждую пробу высевали на несколько разных селективных сред для определения числа различных рекомбинантов, образовавшихся к моменту отбора пробы. Результаты такого эксперимента приведены на рис. 15.13; исследовавшиеся маркеры обозначены буквами А, В, С и D. Как показывает этот рисунок, чем дольше конъюгируют пары клеток до момента разделения, тем больше генетического материала переносится из клеток Hfr в клетки F^- . Если, например, разделить конъюгирующие пары через 10 мин, то к этому моменту будет перенесен только ген А. Если конъюгация продолжается 15 мин, будут перенесены гены А и В; через 20 мин будут перенесены гены А, В и С и т. д.

Эти эксперименты показали, что донорная клетка медленно вводит одну из нитей хромосомы в реципиентную клетку, так что хромосомные гены входят в нее в определенной последовательности. Если конъюгация не прерывается, она идет до тех пор, пока не перенесется вся хромосома; у *E. coli* при 37°C этот процесс занимает примерно 90 мин.

Рис. 15.12. Происхождение трех разных мужских клеток Hfr от одного родительского штамма. Стрелки на каждой хромосоме указывают в каждом случае, начальную точку и направление переноса хромосомы.



клетки не синхронизированы в отношении начала переноса. Одни клетки начинают перенос почти сразу, другие — с задержкой различной продолжительности. Однако через 25 мин перенос начинается во всех клетках. Точка пересечения каждой кривой с осью абсцисс указывает, в какой момент данный ген появляется в зиготе в первой из конъюгирующих пар, т. е. когда начинается перенос.

Если конъюгация не прерывается искусственно, в значительном числе случаев происходит спонтанный разрыв хромосомы. Разрыв каждой из хромосом происходит в случайный момент времени; время переноса очень редко превышает 90 мин. Таким образом, чем дальше от начальной точки переноса расположен данный маркер, тем меньше вероятность, что он будет перенесен до разрыва хромосомы. Перенос самого раннего маркера А произойдет почти во всех парах; перенос В произойдет в меньшем числе пар; еще меньше будет число переносов маркера С и т. д. Это явление отражается в относительной высоте плато, на которые выходят кривые рис. 15.13.

Таким образом, порядок переноса маркеров можно определить двумя способами: по времени входа каждого маркера в экспериментах с прерванной конъюгацией и по частоте рекомбинации каждого маркера, если конъюгация не прерывается. Например, маркер А, который начинает входить в

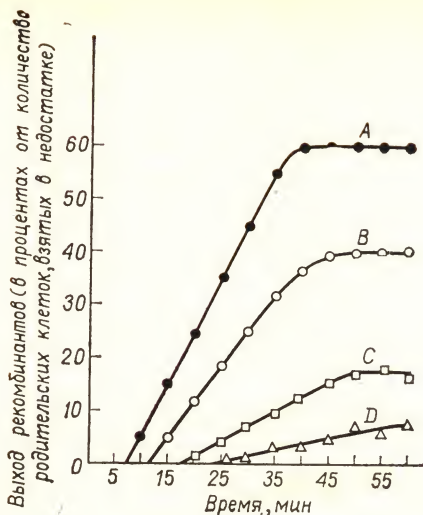


Рис. 15.13. Кинетика образования рекомбинантов (объяснения см. в тексте) (По Е. Вольману и Ф. Жакобу.)

женскую клетку на 7-й минуте, дает в конце концов частоту рекомбинации 60% (т. е. 60% пар, конъюгацию которых не прерывали, дают рекомбинанты по маркеру A). Маркер B входит на 12-й минуте и дает частоту рекомбинации 40%, а маркер C входит на 17-й минуте и дает частоту рекомбинации 15%. Такой градиент частот рекомбинации характерен для скрещивания $Hfr \times F^-$; вероятность рекомбинации снижается так резко, что последний маркер, входящий в женскую клетку, рекомбинирует с частотой, не превышающей 0,01%.

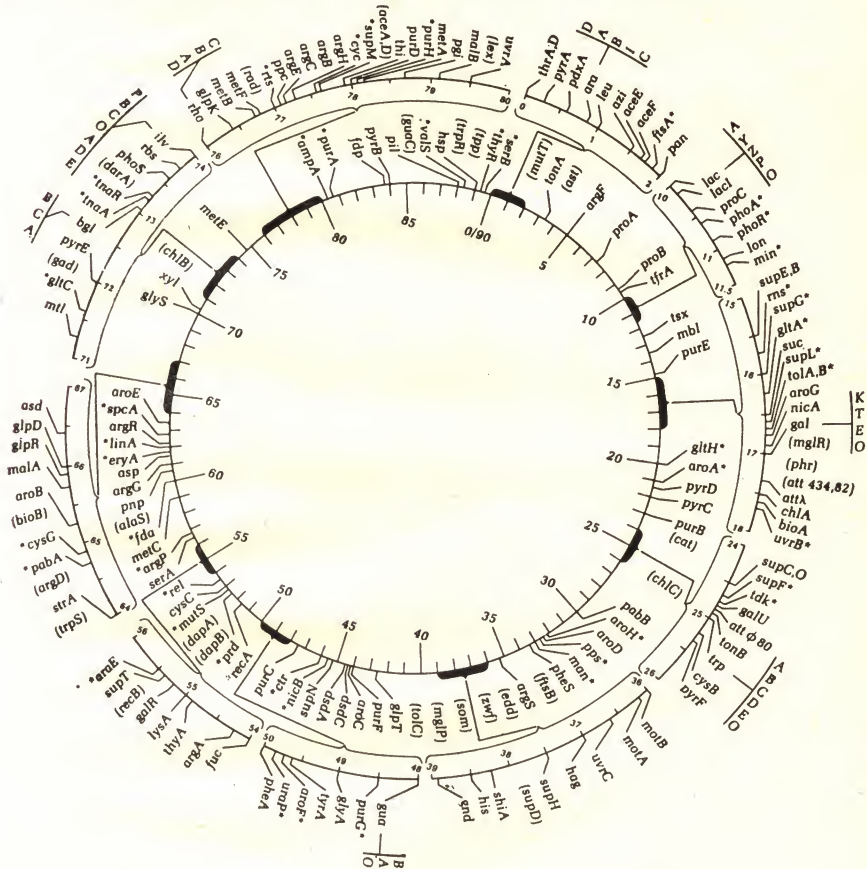
Было показано, что скорость переноса хромосомы примерно постоянна на протяжении всего полового процесса, поэтому время входа маркеров соответствует относительному расстоянию между ними. Поскольку вся хромосома длиной $5 \cdot 10^6$ пар оснований переносится за 90 мин, каждая минута шкалы времени на рис. 15.13 соответствует примерно $5 \cdot 10^4$ парам оснований. Генетическая карта хромосомы *E. coli* K12 приведена на рис. 15.14. Положение маркеров, «расстояние» между которыми составляет более полминуты, было определено по времени входа в экспериментах с прерыванием конъюгации; маркеры, лежащие слишком близко друг к другу, чтобы их положение можно было определить с помощью этого метода, картировали путем анализа сцепления при фаговой трансдукции. Этот процесс будет описан ниже в настоящей главе.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И СВОЙСТВА F' -ШТАММОВ

Переход из состояния F^+ в состояние Hfr зависит от интеграции F-фактора с хромосомой путем рекомбинации. Как было указано выше, этот процесс обратим: в любой культуре штамма Hfr может произойти отделение F-фактора от хро-

301

ками, картированы точнее, чем маркеры, указанные в скобках, однако их положение относительно соседних маркеров точно не известно. [Taylor A. L., Trotter C. D., Linkage map of *Escherichia coli* strain K12, Bacteriol. Rev., 36, 504 (1972).]

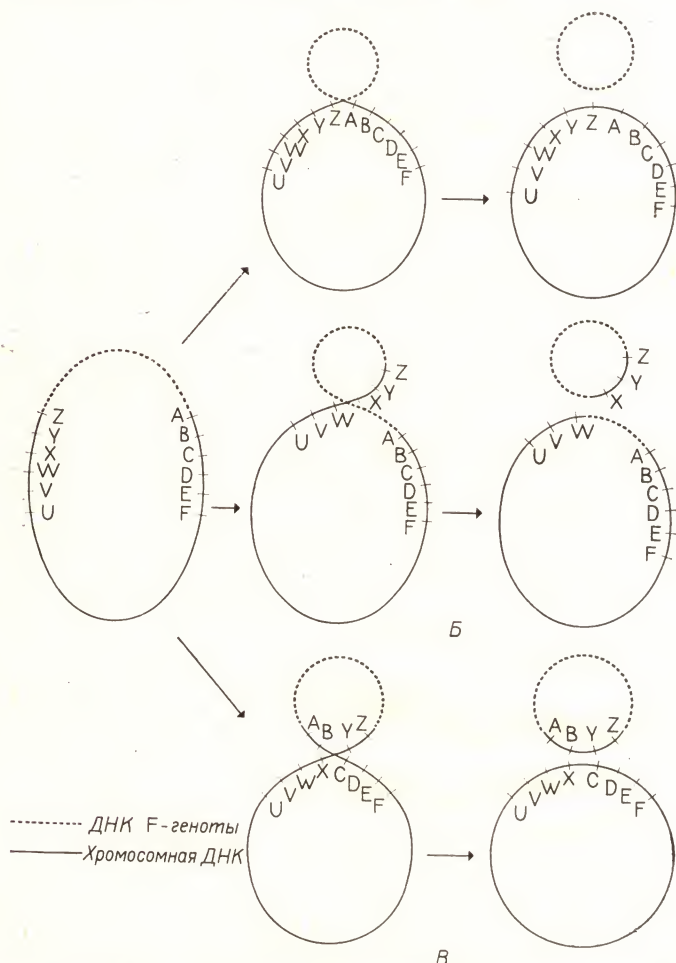


Чтобы имел место истинный возврат к F^+ -состоянию, рекомбинация должна произойти по тем же сайтам, где произошла интеграция (рис. 15.15, *вверху*). Однако иногда наблюдается необычное спаривание. Рекомбинация в сайтах, отличных от сайтов интеграции, приводит к образованию F-фактора, *кольцевая молекула которого содержит фрагмент хромосомы*.

Рис. 15.15. Образование F-геноты в первичных F'-клетках. Слева изображена хромосома *Hfr*, с которой интегрирована ДНК F-геноты. Буквами от А до F и от U до Z обозначены хромосомные маркеры. А. Кроссинговер в месте первоначального спаривания F-фактора и хро-

мсомы приводит к восстановлению исходного F-фактора. Б. Спаривание с другим участком хромосомы и последующий кроссинговер приводит к образованию F-геноты, несущей хромосомные маркеры XYZ. Хромосома первичной F'-клетки содержит часть ДНК F-фактора и имеет деле-

цию в области XYZ-маркеров. В. Спаривание с участком, отличным от первых двух, приводит к образованию F-геноты, содержащей всю ДНК F-фактора и хромосомные гены, располагавшиеся по обе стороны от сайта интеграции.



сомной ДНК (рис. 15.15, средний и нижний ряды). Как показано на рис. 15.15, в такой F-геноте¹ может присутствовать целая F-ДНК или ее фрагмент.

¹ В этом отношении F-геноты аналогичны трансдуцирующему фагу. — 302 Прим. ред.

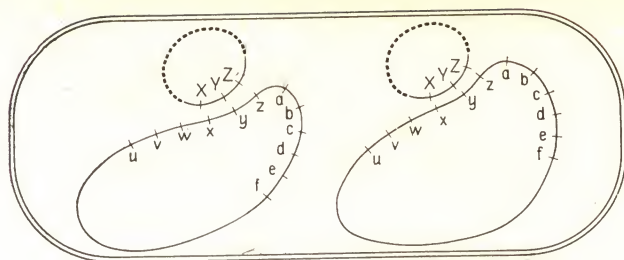


Рис. 15.16. Вторичная F' -клетка, являющаяся гетерозиготным диплоидом по генам X, Y и Z.

..... ДНК F-геноты
 — Хромосомная ДНК

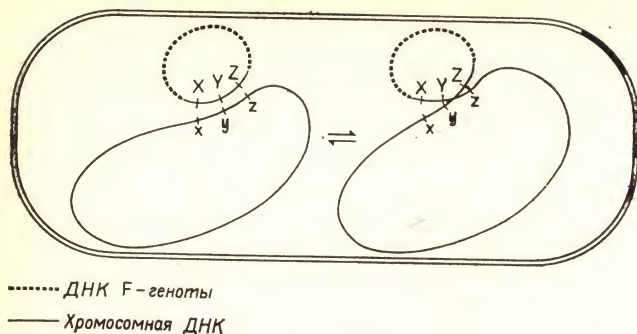
Клетка, в которой произошло это событие, и возникший клон называют *первичными* F' -клетками. Эти клетки несут делецию в хромосоме, соответствующую тому фрагменту, который теперь является составной частью F-фактора. Если этот фрагмент содержит гены, ответственные за жизненно важные функции клетки (например, синтез полимераз нуклеиновых кислот или компонентов рибосом), F-генот становится практически второй хромосомой клетки; ее утрата ведет к гибели клетки.

При скрещивании первичных F' -клеток с клетками F^- -штамма перенос F (вместе с интегрированным участком хромосомы) происходит с высокой эффективностью. В то же время перенос хромосомы происходит с эффективностью менее 10^{-5} , так как вероятность интеграции F' -фактора с хромосомой в первичных F' -клетках так же низка, как и в обычных F^+ -клетках.

F-генота, перенесенная в F^- -клетку, восстанавливает свою кольцевую структуру и становится автономным репликоном. Образуется *вторичная* F' -клетка. Она отличается от первичной F' -клетки тем, что фрагмент хромосомы, присутствующий в F-геноте, имеется и в хозяйской хромосоме; таким образом, вторичная F' -клетка является частичным диплоидом (рис. 15.16) и F-генота не является для нее необходимым генетическим элементом.

Частичная диплоидность вторичной F' -клетки делает ее довольно эффективным донором хромосомных генов, так как в ней легко происходят спаривание и рекомбинация. На самом деле культура вторичного F' -штамма всегда представляет собой смесь F' - и Hfr-клеток, причем эти два типа клеток находятся в динамическом равновесии друг с другом, как показано на рис. 15.17. Если такую культуру скрестить с F^- -штаммом, то клетки, содержащие к моменту конъюгации свободную F-геноту, переносят только этот фактор; остальные клетки, в которых F-фактор к этому моменту оказался интегрированным с хромосомой, переносят всю интегрированную

Рис. 15.17. Динамическое равновесие между интегрированным и свободным состоянием F-геноты во вторичной F'-клетке.



Первый F'-штамм был открыт случайно при выделении донорных клеток с высокой частотой переноса из культуры Hfr, ревертировавшей к F⁺-состоянию; клетки с высокой частотой переноса оказались первичными F'-клетками. Тогда же был разработан метод отбора вторичных F'-штаммов. Обозначим маркеры, которые переносятся штаммом Hfr, буквами от A⁺ до Z⁺; напомним, что Z⁺ — последний из переносимых маркеров — в норме не появляется среди рекомбинантов раньше чем через 90 мин после начала конъюгации. Но если культура Hfr содержит редкие F'-клетки, в которых маркер Z⁺ соединен с F-фактором, то клетка переносит F-Z⁺-фактор за первые 10—20 мин. Таким образом, метод отбора заключается в том, что конъюгацию прерывают примерно через 20 мин и отбирают редкие реципиентные клетки, которые приобрели маркер Z⁺. Обычно эти клетки оказываются вторичными F'-клетками, несущими фактор F-Z⁺. Именно так были выделены F-lac-диплоиды, описанные в гл. 13.

Более эффективная система для отбора вторичных F'-штаммов была предложена К. Лоу (K. Low) после открытия мутантов *E. coli* K12 гес⁻-типа (дефектных по рекомбинации). Лоу показал, что при скрещивании штамма Hfr со штаммом гес⁻F⁻ мерозиготы, которые получают фрагменты хромосомы путем обычного переноса ДНК, не могут образовывать колонии на агаре, селективном по отношению к рекомбинантам, так как интеграция перенесенной ДНК невозможна. В то же время реципиентные клетки, получившие F-геноту, становятся вторичными F'-клетками и образуют колонии на селективном агаре. Таким образом, любая «рекомбинантная» колония, образовавшаяся на селективном агаре при скрещивании Hfr × F⁻-гес⁻, должна быть вторичным F'-штаммом.

Динамическое равновесие между интегрированным и свободным состоянием F-геноты во вторичной F'-клетке и динамическое равновесие в F⁺- или Hfr-культурах различаются только скоростями интеграции и исключения. В случае вторичного F'-штамма интеграция и исключение происходят в

среднем один раз за 10 клеточных генераций; в системе $F^+ \rightleftharpoons Hfr$ интеграция и исключение происходят с частотой примерно 10^{-5} за одну клеточную генерацию.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ПЛАЗМИД

R-ФАКТОРЫ

Во время вспышки бактериальной дизентерии в Японии в 1955 г. был выделен штамм *Shigella dysenteriae*, который обладал устойчивостью одновременно к четырем лекарственным препаратам: сульфаниламиду, стрептомицину, хлорамфениколу и тетрациклину. Хотя раньше такая множественная устойчивость не обнаруживалась, штаммы этого типа становились все более и более распространенными, и к 1964 г. более 50% всех штаммов *Shigella*, выделенных в больницах Японии, обладали этим свойством.

В 1962 г. во время вспышки кишечной инфекции в одной лондонской больнице был выделен штамм *Salmonella* с множественной устойчивостью к лекарственным препаратам, а к 1965 г. доля штаммов *Salmonella*, обладающих множественной устойчивостью, достигла в Англии 61%. С тех пор кишечные бактерии, обладающие таким свойством, были выделены повсеместно.

К. Ошиаи (K. Oshiai), Т. Акиба (T. Akiba) и их сотрудники в Японии обнаружили, что генетические детерминанты устойчивости к лекарственным препаратам переносятся при конъюгации совместно. Дальнейшие исследования, в первую очередь в лаборатории Т. Ватанабе (T. Watanabe), позволили установить, что гены устойчивости входят в различных комбинациях в состав трансмиссибельных плазмид, которые теперь называются R-факторами (от слова resistance — устойчивость). Быстрое распространение R-факторов в популяциях кишечных бактерий в условиях сильного давления отбора, обусловленного профилактикой и терапией с применением антибиотиков, привело к преобладанию во всем мире кишечных бактерий с множественной устойчивостью.

Число веществ, устойчивость к которым переносится R-факторами, увеличилось до восьми и более антибиотиков, нескольких тяжелых металлов (ртуть, кадмий, никель, кобальт) и сульфамидов. Различные R-факторы содержат разные комбинации генов устойчивости, а число генов колеблется от одного до семи или восьми. Механизмы устойчивости, сообщаемой этими генами, обычно отличаются от механизмов, которые определяются хромосомными генами. Плазмидные гены, как правило, кодируют ферменты, химически инактивирующие лекарственные препараты, а хромосомные гены устойчивости обычно изменяют мишень действия лекарственного препарата в клетке. Это различие согласуется с тем фак-

том, что гены, содержащиеся в плазидах, по крайней мере при некоторых условиях не являются для клетки необходимыми.

R-фактор состоит из двух разных фрагментов ДНК: один из них называется *RTF* (от *resistance transfer factor* — фактор переноса устойчивости) и несет гены, ответственные за репликацию и перенос плазмиды; другой фрагмент состоит из одного или нескольких соединенных последовательно *r-детерминантов* (детерминантов устойчивости). *RTF* были выделены из нескольких R-факторов, их мол. веса равны примерно $6 \cdot 10^7$, тогда как соответствующие наборы г-детерминантов имеют мол. вес примерно $1 \cdot 10^7$. Фрагменты ДНК *RTF*- и г-детерминантов имеют, кроме того, разное ГЦ-содержание и, следовательно, разную плавучую плотность. Это позволяет предположить, что их эволюционное происхождение также различно.

Действительно, некоторые R-факторы могут диссоциировать на независимо реплицирующиеся *RTF*- и г-детерминанты; таким образом, последние, видимо, являются самостоятельными репликонами, но способны осуществлять перенос только при мобилизации их с помощью *RTF*. Стабильность комплексов сильно варьирует в зависимости от самого R-фактора и от клетки-хозяина. Некоторые R-факторы никогда не диссоциируют в одной бактерии-хозяине, но легко диссоциируют в другой. Обратная ассоциация, возможно, обусловлена интеграцией *RTF* с г-детерминантами.

Е. Андерсон (E. Anderson) и его сотрудники обнаружили, что некоторые природные штаммы *Salmonella* несут только *RTF*-детерминанты; выявили эти детерминанты следующим образом. Путем раннего прерывания конъюгации с донором R-фактора был создан штамм, который содержал г-детерминант, но не содержал *RTF*. Этот штамм вначале скрещивали с потенциальным донором *RTF*, а затем с чувствительным к антибиотикам реципиентом. Перенос *RTF* от донора обнаруживали благодаря тому, что проверяемый штамм приобретал способность к переносу устойчивости к лекарственному препарату другому реципиенту (рис. 15.18).

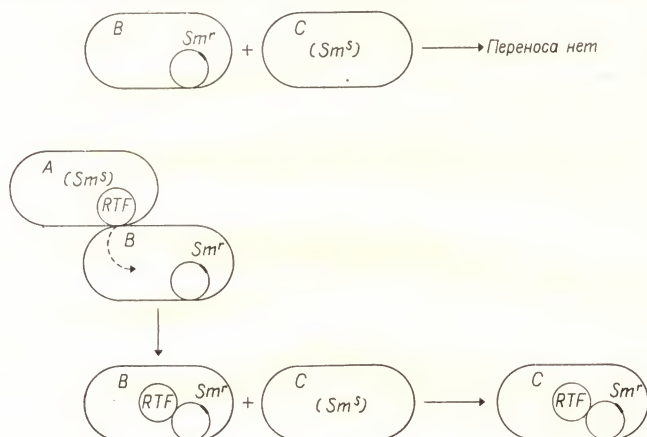
Итак, некоторые (возможно, даже все) г-детерминанты способны к автономной репликации, но не к самостоятельному переносу. Гены, контролирующие процесс конъюгации, расположены только в *RTF*-детерминантах, чья функция в клетках, чувствительных к лекарственным препаратам, совершенно неизвестна.

Многие R-факторы, выделенные из кишечных бактерий, можно подразделить на несколько отдельных *групп несовместимости*. Группа несовместимости — это группа плазмид, из которых никакие две не могут устойчиво сосуществовать в одной клетке-хозяине. Две или более плазмиды, относящиеся к

Рис. 15.18. Тест на присутствие фактора переноса устойчивости (RTF). Тестируемый штамм В несет г-детерминант устойчивости к стрептомицину, не способный к самостоятельному переносу; С — чувствительный к стреп-

томицину штамм, не содержащий плазмид. Если смешать клетки В и С (верхний ряд), перенос не осуществляется, но если вначале смешать клетки штамма В с клетками А, а затем с С, то детерминант устойчивости к стреп-

цину переносится. Это показывает, что в штамме А присутствует способный к переносу RTF. (В качестве контроля смешивают штаммы А и С; при этом рекомбинанты, устойчивые к стрептомицину, не образуются.)



лицироваться в одном и том же хозяине. Как мы будем обсуждать далее, в разделе, посвященном пенициллиназным плазидам, несовместимость, по всей вероятности, обусловлена конкуренцией между членами данной группы за место прикрепления на мембране. Плазмиды, относящиеся к одной группе несовместимости, видимо, обладают следующими сходными свойствами. Во-первых, как показано в опытах с применением фагов, специфичных к мужским клеткам, они образуют одинаковые с химической точки зрения половые пили. Во-вторых, их ДНК содержат гомологичные последовательности оснований; это было показано в экспериментах по образованию гетеродуплексов.

Все R-факторы несут гены репрессоров, регулирующих образование пилей. Сразу после заражения популяции клеток каким-либо R-фактором у большинства клеток образуются половые пили, и в течение некоторого времени эти клетки ведут себя как доноры. Однако вскоре проявляется действие репрессора, число пилей уменьшается и по мере роста популяции они исчезают совсем. Поэтому в устойчивой культуре R⁺-клеток лишь немногие клетки образуют R-пили и являются активными донорами.

Некоторые R-факторы способны обеспечивать перенос хромосомы *E. coli*. Из R⁺-популяций были выделены стабиль-

ные Hfr-клоны и описаны R-факторы, которые ведут себя подобно F-факторам. Эти данные показывают, что некоторые R-факторы, подобно F1, могут обратимо интегрироваться с хромосомой *E. coli*.

Col-ФАКТОРЫ

Многие штаммы бактерий выделяют белковые токсины, называемые *бактериоцинами*. Они обладают активностью только в отношении близкородственных штаммов. Токсины этого типа, выделяемые штаммами *E. coli*, называют *колицинами*. Как правило, это простые белки; было выделено несколько разных типов колицинов, убивающих чувствительные клетки разными способами. Обычно штаммы *E. coli* устойчивы к тем колицинам, которые они сами производят.

П. Фридерик (P. Fredericq) показал, что генетические детерминанты ряда колицинов содержатся в плазмидах и никогда не интегрируются с хромосомой. Эти плазмиды называются *колициногенными Col-факторами*. Основные изученные Col-факторы — Col B, Col E₁, Col E₂, Col I и Col V; колицины, которые они образуют, обозначаются соответствующими буквами.

Некоторые Col-факторы, в том числе Col B, Col I и Col V, содержат «детерминанты фертильности», т. е. набор генов, ответственных за конъюгацию и перенос плазмиды. Два Col V-фактора вызывают образование половых пилей для обеспечения переноса хромосомы и, подобно F-фактору, весьма чувствительны к акридиновому оранжевому. Учитывая легкость, с которой Col-факторы рекомбинируют с другими плазмидами, нельзя исключить возможность того, что F-подобные Col-факторы возникли путем интеграции Col-плазмиды с F-фактором.

Другие Col-плазмиды, в том числе Col E₁ и Col E₂, не способны к самостоятельному переносу. Но если клетка несет наряду с Col E₁ (или Col E₂) трансмиссибельную плазмиду, то переносятся обе плазмиды. Возможно, такой совместный перенос обусловлен временной интеграцией двух плазмид; однако есть основания полагать, что в ряде случаев у нетрансмиссибельной плазмиды просто отсутствуют один или несколько генов, необходимых для конъюгации, и недостающая функция (например, синтез фермента) выполняется активной плазмидой. Следует отметить, что Col E₁ и Col E₂ мобилизуются не только трансмиссибельными Col-факторами, но и F-фактором.

Плазмида Col E₁ может со своей стороны обеспечить какую-либо слабо выраженную у трансмиссибельной плазмиды Col I функцию. Хотя Col I обеспечивает собственный перенос с высокой эффективностью, хромосомные маркеры переносит всего одна Col I⁺-клетка из 10⁸. Но если Col I⁺-клетки заражены одновременно Col E₁, эта вероятность увеличивается в

100 раз. Если допустить, что перенос хромосомы обусловлен ее интеграцией с Col I, то можно предположить, что Col E₁ образует более активный фермент интеграции.

ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ У *PSEUDOMONAS*

Для псевдомонад характерна способность катаболизировать множество необычных органических соединений с помощью особых метаболических путей. И. Гунсалус (I. Gunsalus) и А. Чакрабарти (A. Chakrabarty) с сотрудниками обнаружили, что ферменты ряда особых метаболических путей детерминируются плазмидными генами. В каждом случае плазмиды кодируют ферменты одного метаболического пути или его части. Например, ферменты расщепления камфары кодируются «камфарной плазмидой» из *P. putida*, ферменты расщепления октана — «октановой плазмидой», а ферменты расщепления салициловой кислоты — «салициловой плазмидой». Эти плазмиды переносятся внутри видов и между видами псевдомонад путем конъюгации.

ПЕНИЦИЛЛИНАЗНЫЕ ПЛАЗМИДЫ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Это патогенная для человека бактерия, которая вызывает инфекции кожи и ран. Пенициллин в начале его применения был весьма эффективен в подобных случаях, но очень скоро возникли устойчивые к этому препарату стафилококки, и к 1950 г. большинство выделяемых штаммов оказались высокорезистентными.

Высокая резистентность во всех случаях обусловлена образованием активного фермента *пенициллиназы*, который разрушает антибиотик, гидролизуя β -лактамовое кольцо. Как было показано Р. Новиком (R. Novick), ген, кодирующий этот фермент (p^+), вместе с другими генами, участвующими в его регуляции, содержится в большинстве штаммов в плазмиде. Об этом свидетельствуют следующие факты.

1. Устойчивые к пенициллину клетки теряют это свойство полностью и необратимо со скоростью примерно один раз за 1000 клеточных делений (рис. 15.19).

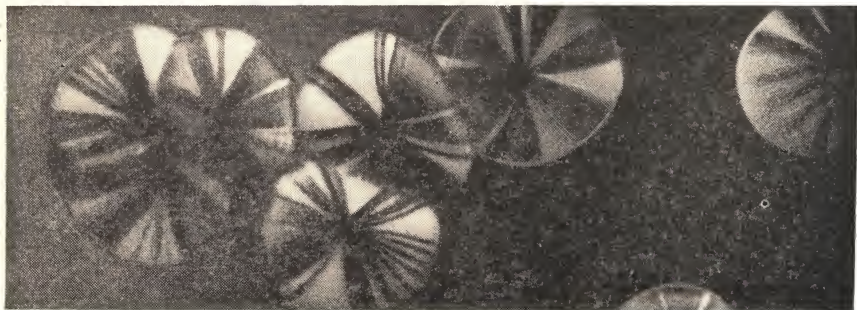
2. При фаговой трансдукции выявляется, что с p^+ тесно сцеплен ряд маркеров, включая устойчивость к ионам ртути (Hg^r) и к эритромицину (ero^r). Если облучить фаговые частицы УФ-светом, все три маркера инактивируются одновременно (имеется в виду их способность образовывать рекомбинантные трансдуктанты среди фагового потомства), и этот процесс характеризуется одинаковой во всех случаях одноударной кинетикой.

3. Штаммы, несущие гены $p^+Hg^r-ero^r$, теряют все три маркера вместе, а затем вновь приобретают их в результате одного акта трансдукции.

Рис. 15.19. Колонии стафилококков, обработанные N-фенил-1-нафтиламиназо - О - карб-

оксибензолом и пенициллином. Темные секторы содержат клетки, вырабатывающие пеницилли-

назу, светлые — клетки без пенициллиназы. (С любезного разрешения Р. Новика.)



Хотя детерминанты устойчивости к пенициллину несут не все стафилококковые плазмиды, наиболее интенсивно изучались пенициллиназные плазмиды. Эти плазмиды были разделены на несколько типов, α , β , γ и т. д., на основании тех маркеров, которые они несут, и химически различающихся пенициллиназ, которые они образуют.

Плазмиды разных типов, подобно некоторым из описанных ранее R-факторов, проявляют *несовместимость*. Если две несовместимые плазмиды, несущие генетические маркеры, ввести в одну клетку, то 95% клеток, образующихся после первого деления, будут относиться к одному из двух типов, а в течение еще нескольких клеточных делений сегрегация будет завершена. В таких сегрегантах очень часто встречаются рекомбинантные плазмиды, а частоты, с которыми независимо рекомбинируют различные маркеры, достаточны для построения генетических карт плазмид. В противоположность этому совместимые плазмиды рекомбинируют редко.

Изложенные данные привели к следующей гипотезе. Каждая плаزمида содержит локус «поддержания несовместимости» (*ms*), с помощью которого она присоединяется к определенному месту в клетке (предположительно к участку клеточной мембраны). Такое прикрепление необходимо для репликации плазмиды. Совместимые плазмиды несут разные локусы *ms*, позволяющие им прикрепляться к разным участкам. Несовместимые же плазмиды содержат одинаковые локусы *ms* и вынуждены конкурировать за одно и то же место прикрепления. Если две несовместимые плазмиды поместить в одну клетку, они будут интегрироваться друг с другом (с помощью одного кроссинговера), но быстро сегрегируют в результате последующих кроссинговеров; если расстояние между участками, где произошли кроссинговеры, достаточно ве-

лико, то обнаруживаются рекомбинанты по известным маркерам.

Эта гипотеза подтверждается рядом данных: мутанты плазмид, у которых локус *ms* утрачен в результате делеции, теряют способность к автономной репликации; были обнаружены хромосомные и плазмидные мутации, заметно снижающие стабильность плазмид. Хромосомный ген, в котором происходят мутации такого рода, видимо, участвует в образовании места прикрепления в клетке, так как он специфически влияет на стабильность плазмид той или иной группы несовместимости, но не обеих групп. Плазмидный ген, в котором происходят такие мутации, вероятно, и является локусом *ms*; плазмидная мутация, снижающая стабильность плазмиды, не отделяется от того аллеля *ms*, с которым она вначале была связана.

Изучалось также взаимодействие между пенициллиназными плазмидами и хромосомой клетки-хозяина. Оказалось, что плазмидный маркер, введенный путем фаговой трансдукции в хромосому, становится стабильно интегрированным с ней. Плаزمид, несущая тот же маркер, может в этом месте интегрироваться с бактериальной хромосомой путем кроссинговера в гомологичной области. Возможен и обратный процесс — исключение хромосомного маркера под действием плазмиды.

Стафилококковые плазмиды не вызывают конъюгации, однако они могут переноситься из клетки в клетку путем фаговой трансдукции. Видимо, этот процесс происходит со скоростью, достаточной для того, чтобы уравновесить спонтанную утрату плазмиды, и, таким образом, поддерживает **присутствие плазмид в природных популяциях стафилококков**. До начала широкого использования пенициллина в медицинской практике равновесное содержание пенициллиназных плазмид в популяции было, вероятно, очень низким; но пенициллин действовал как фактор отбора, и в результате во многих местах стали преобладать штаммы, содержащие плазмиды.

КРИПТИЧЕСКИЕ ПЛАЗМИДЫ

Когда обнаружили, что плазмидную ДНК можно выделить с помощью ультрацентрифугирования в виде маленьких, ковалентно замкнутых кольцевых молекул, такие молекулы стали искать в самых разных бактериях. Оказалось, что они присутствуют в клетках почти всех изученных видов. Эти молекулы ДНК называли *криптическими* (скрытыми плазмидами, так как они не содержат генов, которые можно было бы обнаружить по их фенотипическому выражению).

Таким образом, присутствие плазмид в бактериальных клетках — это широко распространенное явление, а не исключение. Ниже приведены некоторые гипотезы относительно их происхождения.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ
ПЛАЗМИДАМИ, ВИРУСАМИ
И ХРОМОСОМАМИ

Как уже указывалось выше в настоящей главе, плазмиды обладают следующими свойствами.

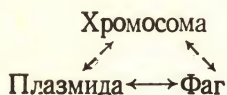
1. Это кольцевые молекулы двухцепочечной ДНК.
2. Они способны к автономной репликации в хозяйской клетке.
3. Некоторые из них могут интегрироваться друг с другом и с хромосомами клетки-хозяина, а также обмениваться фрагментами генетического материала друг с другом и с хозяйскими хромосомами.
4. Многие плазмиды несут гены, влияющие на фенотип клетки-хозяина.
5. Некоторые плазмиды обеспечивают собственный перенос при конъюгации клеток-хозяев.
6. Трансмиссибельные плазмиды могут осуществлять перенос других плазмид, находящихся в той же клетке, или перенос самой бактериальной хромосомы.
7. Плазмиды не являются необходимыми для хозяйской клетки (по крайней мере при некоторых условиях).

Все эти свойства, кроме трех последних, характерны также и для бактериальной хромосомы. Таким образом, нетрансмиссибельные плазмиды отличаются от хромосомы только тем, что не являются необходимыми. Но даже этот критерий относителен, поскольку можно выделить F'-клетки, в которых гены, необходимые для роста бактерий, входят в состав F-геноты, а не хромосомы. В этом случае F-геноты является необходимой, и, согласно нашему определению, ее следует считать второй хромосомой, а не плазмидой.

Так же близки между собой плазмиды и ДНК-содержащие фаги. Последние обладают всеми теми же свойствами, что и плазмиды, кроме того, что не могут обеспечивать конъюгацию¹. Однако фаги отличаются от плазмид своей способностью высвобождаться из хозяйской клетки в виде покрытых белком инфекционных частиц. Было высказано предположение, что трансмиссибельные плазмиды весьма близки к некоторым нитевидным ДНК-содержащим фагам и что половые пили аналогичны оболочке фага. Поскольку при конъюгации плазмидная ДНК, видимо, может переноситься через пили, аналогия становится еще более полной.

¹ Даже из этого положения есть исключение, так как фаг, который заражает один из видов *Pseudomonas*, обеспечивает перенос хромосомных маркеров путем конъюгации. Поскольку некоторые псевдомонады содержат F-факторы, этот уникальный фаг мог приобрести детерминанты фертильности путем рекомбинации с такой плазмидой.

Все три генетических элемента в принципе способны рекомбинировать друг с другом, как показано на следующей диаграмме:



С хромосомой могут интегрироваться многие фаги и плазмиды; кроме того, наблюдалась рекомбинация между плазмидой (одним из R-факторов) и фагом, в результате чего возник фаг, несущий ген устойчивости.

Во многих случаях различия между тремя типами генетических элементов совершенно стираются. Например, в состоянии профага фаг P1 реплицируется как автономный необязательный генетический элемент; в этом состоянии он неотличим от плазмиды. Точно так же и плазмида может быть неотличима от хромосомы (как в примере, рассмотренном выше). Таким образом, различать эти три типа генетических элементов позволяют только их потенциальные возможности. Плазмиды *могут* быть необязательными и *могут* обеспечивать конъюгацию; фаги *могут* высвобождаться в виде инфекционных частиц.

Другими словами, эти три типа элементов в каком-то смысле «взаимопревращаемы». Фаг может утратить часть своих функций и стать плазмидой. Плазмида может включить в свой состав необходимые гены и стать хромосомой. Наша задача заключается в том, чтобы попытаться понять эволюционное происхождение этих элементов, т. е. установить, в какой временной последовательности возникали различия между ними. В какой момент реплицирующиеся молекулы ДНК приобрели способность образовывать белковые оболочки и стали, таким образом, инфекционными частицами? Произошли ли плазмиды от фагов или фаги от плазмид? Или они возникли из бактериальной хромосомы в результате независимой эволюции?

Нетрудно представить себе нетрансмиссибельную плазмиду, возникшую из хромосомы, так как известно, что фрагменты хромосомы, образовавшиеся в результате делеций (например, F-геноты), могут переходить в кольцевую форму. Чтобы делетированный сегмент стал нетрансмиссибельной плазмидой, необходимо только, чтобы он содержал репликаторный участок хромосомы. Однако такое состояние будет нестабильным, так как возникшая плазмида несовместима с хромосомой и должна вытесняться из участка прикрепления хромосомы. Таким образом, возникновение стабильной, нетрансмиссибельной плазмиды требует, чтобы одновременно произошла мутация и плазмида приобрела новую специфичность

Гораздо труднее представить себе, какие эволюционные события могли привести к трансмиссивности ДНК, будь то конъюгация или высвобождение фаговых частиц. Вероятно, на все эти вопросы никогда не удастся дать однозначный ответ, но они подчеркивают тесную взаимосвязь между плазмидами, хромосомами и бактериальными вирусами, которая существует в настоящее время.

КОНЪЮГАЦИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ БАКТЕРИЙ

ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ

Грамотрицательная бактерия, получившая в результате конъюгации плазмиду, в принципе может конъюгировать с самыми разными грамотрицательными бактериями и переносить плазмидную ДНК. Однако эффективность межвидовой и внутривидовой конъюгации сильно варьирует; в табл. 15.2

ТАБЛИЦА 15.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНЪЮГАЦИИ МЕЖДУ РАЗЛИЧНЫМИ РОДАМИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ¹

Донор F-lac	Реципиент	Частота переноса F-lac ²
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻¹ —10 ⁻³
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhosa</i>	10 ⁻⁴ —10 ⁻⁵
<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	10 ⁻⁵ —10 ⁻⁶
<i>Salmonella typhosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁴ —10 ⁻⁵
<i>Salmonella typhosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	10 ⁻⁴ —10 ⁻⁵
<i>Salmonella typhosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>	10 ⁻⁷ —10 ⁻⁸
<i>Salmonella typhosa</i>	<i>Vibrio comma</i>	10 ⁻⁵ —10 ⁻⁶
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻⁵ —10 ⁻⁶
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<10 ⁻¹⁰

¹ По данным Л. Барона.

² Отметим, что из популяций дикого типа исследуемых объектов можно выделить реципиенты с более высокой частотой переноса.

приведена примерная эффективность переноса F-lac из клеток грамотрицательных кишечных бактерий одного рода в клетки бактерий других родов. Путем переноса соответствующих плазмид из *E. coli* K12 были созданы F⁺- и F'-штаммы кишечных бактерий различных групп. В некоторых случаях эти плазмиды интегрировались с хромосомой реципиента и образовывали донорные клетки Hfr; такие Hfr-штаммы возникли у *Salmonella*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Erwinia amylovora*.

Если в качестве доноров при межвидовом скрещивании используются клетки Hfr, то хромосомная ДНК переносится с частотой, сравнимой с частотой переноса F-lac, указанной в табл. 15.2. Однако в том случае, если между донорной и ре-

ципиентной хромосомой нет достаточной гомологии, чтобы обеспечить спаривание и кроссинговер, рекомбинанты не обнаруживаются. Поэтому при скрещивании между группами *Escherichia*, *Salmonella* и *Shigella*, характеризующимися высокой гомологией, рекомбинанты образуются, а при конъюгации между *Escherichia* и *Proteus* с низкой гомологией не образуются.

Конъюгация, обусловленная плазмидами, встречается не только у кишечных бактерий, но также и у псевдомонад. Плазмиды деградации, описанные в предыдущем разделе, обуславливают конъюгацию между различными видами *Pseudomonas*; кроме того, был открыт F-подобный половой фактор, который вызывает перенос хромосомы с низкой частотой между различными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*.

ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ

Генетика актиномицета *Streptomyces coelicolor* была подробно изучена Д. Хопвудом (D. Hopwood) и Г. Сермонти (G. Sermonti) с сотрудниками. Когда споры двух генетически маркированных штаммов высевают вместе на чашки с селективной средой, возникают рекомбинанты. Для рекомбинации необходим непосредственный контакт между гифами; ответственна за нее плаزمида SCP1. Исходный штамм «IF» несет плазмиду SCP1 в автономном состоянии и обладает небольшой способностью к конъюгации с такими же клетками. Из этого штамма были получены донорные штаммы с высокой частотой рекомбинации («NF»), содержащие плазмиду SCP1, интегрированную по специфическому сайту хромосомы, и штаммы «UF», которые обладают высокой активностью в качестве реципиентов и утратили SCP1.

Между SCP1-системой *S. coelicolor* и F1-системой *E. coli* K12 имеется некоторое сходство. При скрещиваниях IF×UF (так же, как и при скрещиваниях F⁺×F⁻) каждая донорная клетка переносит конъюгационную плазмиду, частота же переноса хромосомы на несколько порядков ниже. При скрещиваниях NF×UF (как при скрещиваниях Hfr×F⁻) каждое спаривание приводит к переносу длинных участков хромосом. В то же время при скрещиваниях UF×UF с низкой частотой образуются рекомбинанты, тогда как при скрещивании между двумя штаммами F⁻ их никогда не бывает. Кроме того, при скрещиваниях NF×UF переносимый фрагмент хромосомы располагается симметрично по обе стороны от места прикрепления SCP1 и каждый реципиент получает интегрированную плазмиду, становясь донором NF. Скрещивания Hfr×F', наоборот, всегда характеризуются полярностью переноса, а перенос интегрированной плазмиды в реципиентную клетку происходит лишь в очень редких случаях — при полном переносе хромосомы.

Было обнаружено, что плаزمида SCP1 «вытягивает» фрагмент хромосомы, несущий ген *cys B*; SCP1-*cys B* аналогична F-*lac*, а клетки, содержащие эту плазмиду, ведут себя так же, как F'-доноры *E. coli* K12, описанные выше.

Измеряя частоты совместного наследования различных генов донора при многофакторных скрещиваниях, Д. Хопвуду удалось построить генетическую карту *S. coelicolor*. Оказалось, что все изученные маркеры относятся к одной группе сцепления и что эта группа кольцевая. Таким же образом была построена генетическая карта другого актиномицета, *Nocardia mediterranei*. Гомологичные маркеры занимают на этих двух картах одни и те же положения, что указывает на тесное филогенетическое родство двух видов.

ТРАНСДУКЦИЯ С УЧАСТИЕМ БАКТЕРИОФАГА

ОТКРЫТИЕ ТРАНСДУКЦИИ

В 1952 г. Н. Циндер (N. Zinder) и Дж. Ледерберг (J. Lederberg) исследовали возможность конъюгации между двумя штаммами *Salmonella*. Когда они смешали штаммы, несущие подходящие генетические маркеры, и посеяли суспензию на чашки с селективной средой, образовалось небольшое число рекомбинантных колоний.

В ходе дальнейших экспериментов Циндер и Ледерберг обнаружили, что этот обмен генетическим материалом произошел не в результате конъюгации, а вследствие высвобождения из одного из родительских штаммов частиц какого-то умеренного бактериофага и заражения им другого родительского штамма. Многие из рецепторных клеток выжили после заражения, и некоторые из них получили фрагменты генетического материала, происходящего из тех клеток, в которых сначала находился фаг.

При *трансдукции*, как называли это явление, небольшой кусок бактериальной хромосомы включается в созревающую фаговую частицу. Когда эта частица заражает новую хозяйскую клетку, она вводит в нее генетический материал предыдущего хозяина. Таким образом, реципиент становится частичной зиготой.

Фаг, открытый Циндером и Ледербергом и названный P22, переносит все маркеры *Salmonella* с примерно одинаковой частотой. Однако при изучении других умеренных фагов *Salmonella* и *E. coli* оказалось, что этой способностью обладают лишь немногие из них. Между тем было открыто, что некоторые умеренные фаги *E. coli* в состоянии профага занимают определенное место в бактериальной хромосоме. Например, ДНК фага λ всегда включается между локусами *bio* и *gal* (рис. 15.14). Когда фаг λ был проверен на способность транс-

оказалось, что он может трансдуцировать локусы *gal* и *bio*, но не маркеры, расположенные на большом расстоянии от сайта интеграции.

Трансдукция типа той, которая осуществляется фагом P22, когда любой хромосомный маркер включается в фаговую частицу с примерно равной вероятностью, называется *общей*. Трансдукция, аналогичная той, что осуществляется фагом λ , когда в состав фага включаются только локусы, непосредственно прилегающие к сайтам интеграции, называется *специфической*. Специфическая и общая трансдукции различаются по механизму введения генетического материала в фаговые частицы.

Трансдукция может происходить между различными организмами, относящимися к группе кишечных бактерий; она наблюдалась также у псевдомонад, стафилококков и бацилл. Поскольку большинство видов бактерий несут умеренные фаги, трансдукция вполне может быть самым распространенным механизмом рекомбинации у бактерий.

МЕХАНИЗМ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТРАНСДУКЦИИ

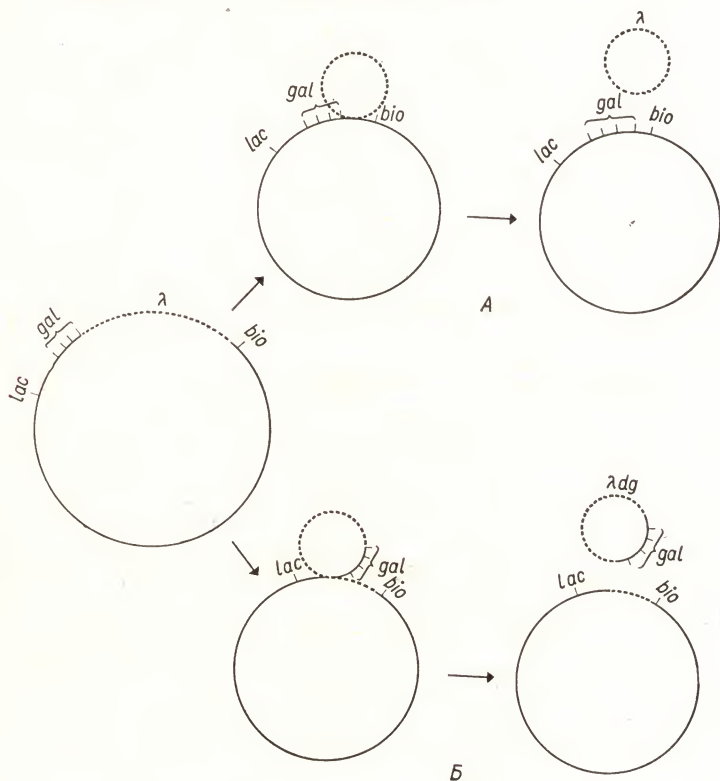
В культуре *E. coli*, лизогенной по фагу λ , каждая клетка содержит профаг, включенный в хромосому между локусами *gal* и *bio*. Если такую культуру индуцировать, то в большинстве клеток исключение профага из хромосомы в результате рекомбинации произойдет строго по сайтам интеграции, но в редких случаях — по другим сайтам; тогда образующаяся в результате рекомбинации кольцевая ДНК фага будет содержать большую часть фаговой хромосомы λ и небольшой участок ДНК клетки-хозяина, располагавшейся с одной или с другой стороны от места включения (рис. 15.20). Если исключавшаяся ДНК содержит гены *gal*, фаговую частицу называют *λdg* , что означает «дефектный фаг λ , несущий локус *gal*» (« *λ defective, carrying the *gal* loci*»). Если исключавшаяся ДНК содержит гены *bio*, то фаговую частицу называют *$\lambda dbio$* . Количество ДНК, которое может быть упаковано в фаговую частицу, ограничено; поэтому, если в фаг включаются гены *gal* или *bio*, то соответствующее количество фаговой ДНК должно быть исключено. Отсюда ясно, почему трансдуцирующая частица всегда дефектна по некоторым функциям λ , а гены *gal* и *bio* никогда не обнаруживаются в одной и той же трансдуцирующей частице.

При индукции лизогенной по λ *gal*⁺-культуры в лизате обнаруживается примерно одна частица *λdg* на 10⁵ нормальных фаговых частиц. Если этот лизат использовать для заражения культуры нелизогенных *gal*⁻-бактерий, то некоторые клетки получают ДНК *λdg* , которая интегрируется с хромосомой. Но каждая из этих клеток несет еще хромосомный локус

Рис. 15.20. Образование фага λdg . А. Нормальное спаривание и последующий кроссинговер

восстанавливают геном фага λ дикого типа. Б. Аномальное спаривание и последующий кроссинг-

овер приводят к образованию генетического элемента λdg .



gal^+/gal^- . Итак, специфическая трансдукция состоит в интеграции с хромосомой дефектного профага, несущего участок ДНК первой клетки-хозяина, расположенный вблизи сайта первой интеграции.

Если инфицировать культуру gal^- с высокой множественностью заражения, то каждая клетка помимо частицы фага λdg получит также частицу нормального фага λ . Такая клетка становится двойным лизогеном, поскольку несет один нормальный и один λdg -профаг. Если культуру, полученную из этого двойного лизогена, индуцировать, то нормальный профаг обеспечит те фаговые функции, по которым дефектен λdg . Это приведет к созреванию фагов обоих типов, и лизат будет содержать одинаковое число фаговых частиц λ и λdg . Если теперь использовать этот лизат для трансдукции свежей культуры gal^- , то примерно половина фаговых частиц трансдуцирует локус gal^+ . Это явление называется трансдукцией

У *E. coli* был открыт еще один фаг, осуществляющий специфическую трансдукцию, фаг Ø80. Сайт интеграции Ø80 расположен вблизи локуса *trp*, отвечающего за ферменты пути биосинтеза триптофана. Фаг Ø80*dt* (дефектный Ø80, несущий гены *trp*) может быть получен тем же методом, что и λ dg. Из штамма, в котором предварительно произошла интеграция F-*lac* вблизи локуса *trp*, был получен другой трансдуцирующий фаг Ø80, несущий гены *lac*. Эти дефектные трансдуцирующие фаги послужили источником очищенной ДНК, содержащей определенные гены.

МЕХАНИЗМ ОБЩЕЙ ТРАНСДУКЦИИ

При специфической трансдукции фрагмент хозяйской ДНК, которую несет частица трансдуцирующего фага, всегда ковалентно связан с крупным фрагментом фаговой ДНК. При общей же трансдукции этот фрагмент очень небольшой; частицы трансдуцирующего фага представляют собой в основном фрагмент бактериальной ДНК, упакованный в фаговую оболочку. Поэтому лизат, получающийся при общей трансдукции, содержит частицы двух типов: большая часть частиц содержит только фаговую ДНК, а меньшая часть (трансдуцирующие частицы) — главным образом хозяйскую ДНК.

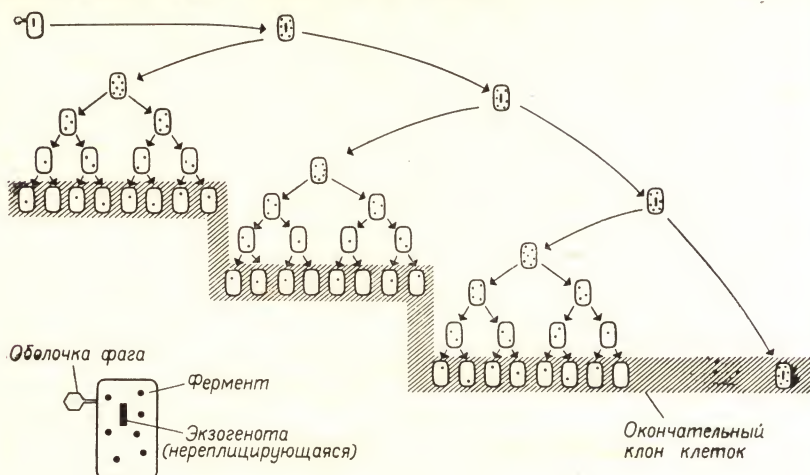
Различие между происхождением ДНК в фаговой частице при специфической и общей трансдукции соответствует способу образования трансдуцирующего начала. Если фаг λ образуется в хозяине в процессе литического цикла, то частицы λ dg не образуются. Чтобы получить такие частицы, лизат надо готовить путем индукции лизогенной по фагу λ культуры (т. е. фаг должен находиться в виде профага). В то же время фаги, осуществляющие общую трансдукцию, включая фаг P1, могут давать трансдуцирующие лизаты как в результате литического цикла развития, так и при индукции лизогена. Это различие связано с разницей в состояниях профага у фагов λ и P1: как было описано в гл. 12, профаг λ обычно интегрирован с бактериальной хромосомой, а профаг P1 существует, как правило, в виде автономной плазмиды.

Некоторые фаги, например P22, могут осуществлять и общую, и специфическую трансдукции. Первый тип трансдукции возможен при литическом цикле развития фага, второй — при индукции лизогенных клеток, содержащих P22, в виде профага, интегрированного с хромосомой.

СУДЬБА ЭКЗОГЕНОТЫ, ОБРАЗУЮЩЕЙСЯ ПРИ ТРАНСДУКЦИИ

При трансдукции обоих типов экзогенота часто спаривается с эндогенотой и донорные гены включаются в рекомбинантную хромосому в результате кроссинговера в области спаривания. Частичная зигота затем сегрегирует и дает гаплоидную

Рис. 15.21. Схематическое изображение этой пов abortивной трансдукции (по Х. Озеки).



экзогенота может также сохраниться как часть профага, тогда возникает гетерозиготный, частично диплоидный клон.

Экзогенота, которая образуется при специфической трансдукции, может сохраниться и функционировать, но не реплицироваться, так что в клоне, возникшем из частичной зиготы, экзогеноту содержит в каждый момент только одна клетка. Это довольно распространенное явление называется *abortивной трансдукцией*. Пусть, например, фаговая частица инъецирует ген *his⁺* в бактерию *his⁻* и возникает abortивная трансдукция. Затем происходят следующие события. В результате функционирования экзогеноты *his⁺* в частичной зиготе образуется фермент синтеза гистидина. Если посеять суспензию клеток на агар без гистидина, зигота будет расти и делиться, но репликации экзогеноты происходить не будет. Таким образом, одна из дочерних клеток не получит гена *his⁺* и сможет продолжать делиться только до тех пор, пока начальная концентрация фермента не станет слишком малой за счет разведения в результате роста. Но другая дочерняя клетка, как и родительская, является гетерогенотой и продолжает синтезировать фермент. При следующем клеточном делении она снова сегрегирует на одну клетку *his⁻*, содержащую ограниченный запас фермента, и одну гетерогеноту *his⁺/his⁻*.

В результате образуется медленно растущая маленькая колония, едва заметная через несколько дней выращивания. Если маленькую колонию такого типа рассеять, она снова даст только одну маленькую колонию, так как ген *his⁺* содержится только в одной из пересейанных клеток. Последовательность событий при abortивной трансдукции представлена на рис. 15.21.

Иногда суспензия фага образует в 10 раз больше абортивных трансдуктантов, чем нормальный фаг. Абортивная трансдукция возникает в тех случаях, когда нормальная рекомбинация между экзогенотой и эндогенотой невозможна. Рекомбинация может быть стимулирована облучением трансдуцированных клеток УФ-светом. Превращение абортивной трансдукции в нормальную под действием УФ-света согласуется с известной его способностью стимулировать рекомбинацию во многих диплоидных системах.

ФАГОВАЯ КОНВЕРСИЯ

Некоторые свойства бактериальных клеток определяются только фаговыми генами. Эти свойства проявляются лишь в лизогенных или зараженных фагом штаммах и никогда не проявляются в штаммах, свободных от фагов. Например, клетки *Corynebacterium diptheriae* образуют токсин только при заражении определенным штаммом фага. Клетка без фага токсина не образует и не может приобрести это свойство в результате мутации. Аналогичным образом некоторые антигенные компоненты клеточной стенки *Salmonella* образуются во всех клетках, зараженных определенным фагом, и никогда не встречаются в клетках, в которых фага нет. Приобретение нового свойства исключительно в результате фаговой инфекции называется *фаговой конверсией*.

Таким образом, конверсия отличается от специфической трансдукции, поскольку в последнем случае фаг переносит ген, который в норме обнаруживается в бактериальной хромосоме. Имеется еще одно различие между конверсией и специфической трансдукцией: частицы фага, вызывающего конверсию, совершенно нормальны и способны осуществлять все необходимые фаговые функции, тогда как специфические трансдуцирующие фаги обычно *дефектны* по некоторым фаговым функциям, поскольку утратили часть фаговых генов при обмене. Однако в остальном фаговая конверсия и специфическая трансдукция с высокой частотой очень сходны.

В свете имеющихся данных нетрудно представить себе процесс эволюции, в ходе которого от общего предшественника возникли бактериальная и фаговая хромосомы. Способность бактериальных генов замещать фаговые гены, и наоборот, приводит к выводу о тесной филогенетической связи между бактериальными вирусами и их хозяевами. Итак, ген, ответственный за то или иное свойство хозяина, может находиться только в бактерии, только в фаге (конверсия) или в них обоих (трансдукция).

РЕКОМБИНАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВИРУСОВ

Бактериальная клетка может быть заражена одновременно двумя близкородственными фагами, отличающимися друг от друга рядом генетических маркеров. Когда хозяйская клетка

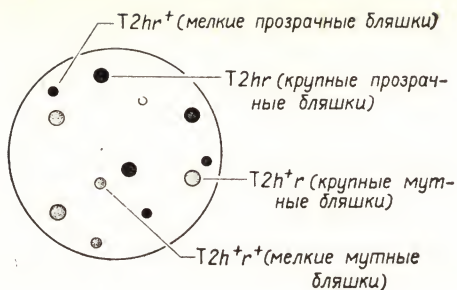


Рис. 15.22. Схематическое изображение бляшек фагов четырех типов.

лизируется, среди частиц фагового потомства обнаруживаются не только оба родительских типа, но и различные генетические рекомбинанты.

Первые исследования рекомбинации фагов были проведены А. Херши (А. Hershey) на мутантах двух типов, описанных в гл. 14: мутантах с быстрым лизисом (*r*) и мутантах по спектру хозяев (*h*). Двойной мутант фага Т2 был получен в две стадии: из мутантной бляшки был выделен *r*-мутант и посеян на чашки со штаммом *E. coli* В/2, чтобы получить двойной мутант Т2*rh*. (Родительский фаг Т2 с аллелями *r*⁺ и *h*⁺ дикого типа можно обозначить Т2++).

Херши заразил *E. coli* В фагами Т2*rh* и Т2++ одновременно и обнаружил, что каждая зараженная клетка дает смешанный лизат, содержащий фаги четырех типов: два родительских типа и рекомбинанты Т2+*h* и Т2*r*+. Все четыре типа можно выявить одновременно путем посева потомства на смешанный индикаторный газон, содержащий равное количество клеток *E. coli* штамма В и штамма В/2. Бляшки, возникающие на таком газоне, показаны на рис. 15.22.

При смешанном заражении оба родительских генома, а также любые рекомбинантные геномы продолжают реплицироваться до тех пор, пока не происходит лизис хозяйской клетки. На протяжении всего времени репликации между любыми двумя геномами может произойти рекомбинация. Скорость такой рекомбинации очень велика, в среднем она составляет более одного акта на каждую частицу за один цикл репликации.

РЕКОМБИНАЦИЯ У ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

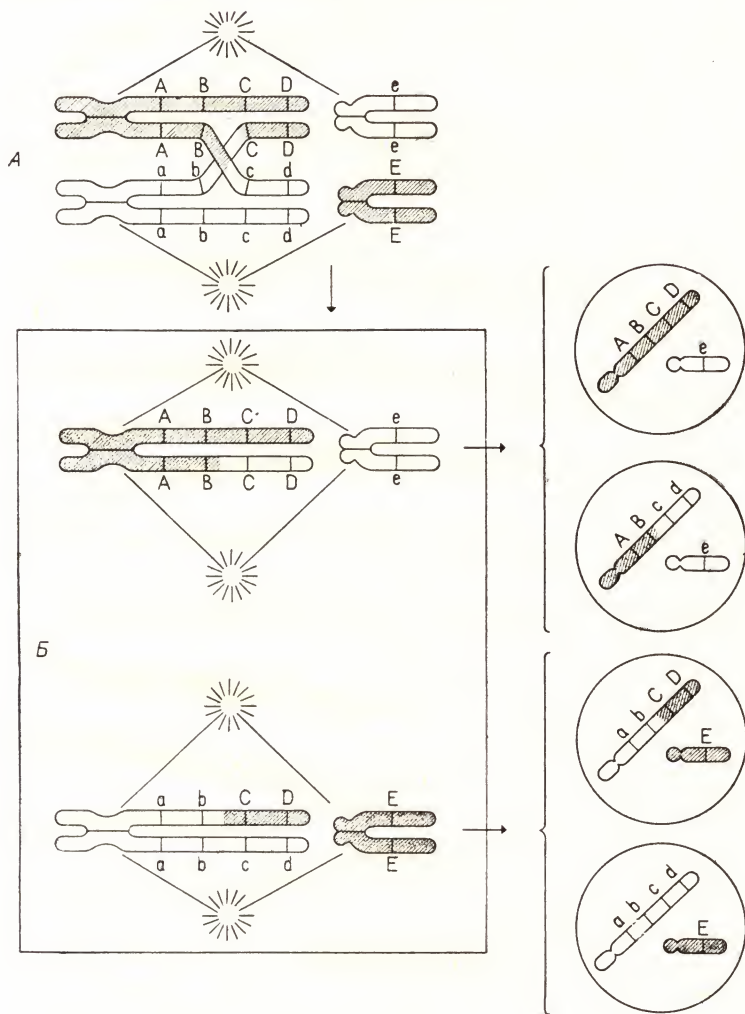
МЕЙОТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

У эукариотических организмов, характеризующихся половым размножением, хромосомная рекомбинация происходит во время мейоза. Стадии мейоза показаны на рис. 3.10. Этот процесс еще раз изображен на рис. 15.23, чтобы продемонстрировать, каким образом генетические маркеры двух роди-

Рис. 15.23. Рекомбинация при мейозе. А. Две гетерозиготные пары гомологичных хромосом. Кроссинговер произошел

между маркерами В и С большой хромосомы. Б. Второе мейотическое деление дает четыре гаплоидных продукта,

каждый из которых характеризуется своей комбинацией пяти маркеров.



тельских типов рекомбинируют в ходе мейоза. Отметим, что новые комбинации возникают двумя способами: во-первых, путем перераспределения родительских хромосом и, во-вторых, путем обмена участками между спаренными гомологичными хроматидами при кроссинговере.

Если один из родителей несет два маркера на разных хромосомах, например маркеры А и Е на рис. 15.23, то вероят-

ность попадания этих маркеров в один и тот же гаплоидный сегрегант составляет 50%. В то же время два маркера, которые входят в зиготу в составе одной и той же родительской хромосомы, например маркеры А и В на рис. 15.23, обязательно попадут в один сегрегант (будут «сцеплены»), если не разойдутся в результате кроссинговера. Поскольку вероятность кроссинговера между двумя маркерами пропорциональна расстоянию между ними, относительные расстояния между любыми двумя сцепленными родительскими маркерами можно найти, определяя относительную частоту рекомбинации во время мейоза. Такие измерения, проведенные для многих пар генов, позволили построить генетические карты для некоторых грибов, в том числе *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* и *Saccharomyces cerevisiae*. Генетическая карта, основанная на данных о мейотической рекомбинации, была также построена для одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*.

Целый ряд данных свидетельствует о том, что у эукариот хромосомная ДНК представляет собой единую двухцепочечную молекулу, скрученную и сложенную неизвестным пока образом. При репликации хромосома образует две *хроматиды*, каждая из которых содержит одну двухцепочечную дочернюю молекулу ДНК. Считается, что механизм кроссинговера между двумя соседними хроматидами такой же, как и в случае вирусов и прокариот. Молекулярная модель кроссинговера уже была представлена в разделе, посвященном рекомбинации у бактерий (рис. 15.2).

ГЕННАЯ КОНВЕРСИЯ

В начале мейоза каждая хромосома представлена четырьмя хроматидами, по две от каждого родителя. В конце мейоза четыре хроматиды сегрегируют и входят в состав четырех гаплоидных геномов потомства. Гетерозиготный маркер (например, маркер А) представлен четырьмя аллелями — двумя А и двумя а — и должен появиться в таком же количестве у четырех гаплоидных потомков, т. е. расщепление должно идти в соотношении 2 : 2. Такое расщепление называется *менделевским*, поскольку его впервые наблюдал и объяснил Мендель.

У многих протистов, в частности у грибов группы аскомицетов, легко выделить четыре продукта мейоза и проверить наследование родительских маркеров. Это так называемый *тетрадный анализ*. Он показывает, что в большинстве случаев расщепление происходит согласно менделевской закономерности. Изредка наблюдается сегрегация в отношении 3 : 1; например, четыре аллеля маркера А на рис. 15.23, которые вступили в мейоз как А, А, а и а, можно обнаружить в четырех клетках потомства в виде А, А, А и а. Таким образом, во

время мейотического процесса один из аллелей *a* может превращаться в *A*. Это превращение, часто происходящее в области кроссинговера, называется *генной конверсией*.

Хотя детали молекулярного механизма генной конверсии пока неясны, ее можно представить как результат следующей последовательности событий. 1. В участках, расположенных случайным образом в четырех двухнитевых молекулах ДНК каждой мейотической тетрады, возникают одонитевые разрывы. 2. В месте каждого разрыва под действием экзонуклеазы образуется пробел. 3. Пробел заполняется при помощи ДНК-полимеразы, причем в качестве матрицы используется *одна из противоположных родительских цепей*. 4. Концы цепи соединяются полинуклеотидлигазой.

Поскольку во время кроссинговера происходят аналогичные события (см. рис. 15.2), ясно, что генная конверсия может осуществляться в том месте, где происходит кроссинговер. Но она может иметь место и в отсутствие кроссинговера. Таким образом, если во время мейоза ген *B* в составе диплоида *ABC/abc* превращается в ген *b*, маркеры *A* и *C* могут рекомбинировать путем кроссинговера, а могут и нет.

МИТОТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

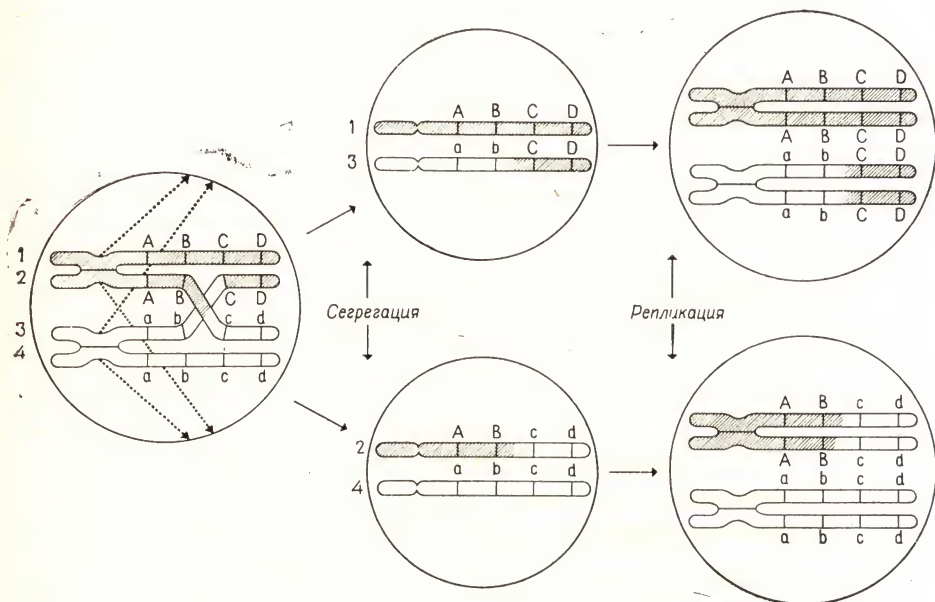
Многие эукариотические микроорганизмы претерпевают многократное клеточное деление в диплоидном состоянии. Такие диплоидные клетки могут впоследствии вступить в мейоз, как это происходит в случае спорообразующих дрожжей, или бесконечно оставаться диплоидными. Во время митотических делений таких диплоидных клеток возможны спаривание гомологичных хромосом и кроссинговер точно так же, как это происходит при мейозе, хотя и с гораздо меньшей частотой. Этот процесс схематически изображен на рис. 15.24; отметим, что в результате митотического кроссинговера между центромерой и гетерозиготным маркером в 50% случаев *данный маркер и все остальные маркеры, дистальные по отношению к нему, переходят в гомозиготное состояние*.

Дочерние клетки, в которые попадают хроматиды, участвовавшие в обмене, обладают тем же набором генов, что и родительская клетка, но образовавшиеся рекомбинантные хромосомы представляют собой новые комбинации генов. Таким образом, дочерняя клетка может измениться *фенотипически*, поскольку гомозиготное состояние дает рецессивному признаку возможность проявиться. Предположим, например, что маркер *D* на рис. 15.24 отвечает за образование пигмента в спорах гриба, причем аллель *D* дикого типа (доминантный) продуцирует зеленый пигмент, а мутантный аллель *d* (рецессивный) — желтый. Споры, несущие гены *D/d*, будут зелеными, а споры *d/d*, возникшие в результате митотического кроссинговера, — желтыми.

Рис. 15.24. Рекомбинация при митозе. Показана только бóльшая хромосома из тех, что изображены на рис. 15.23; кроссинговер в этом случае также происходит между маркерами В и

С. Во время митоза одна хроматида каждой из родительских хромосом движется к одному полюсу, другая — к другому. В данном случае хроматиды 1 и 3 мигрировали к одному полюсу,

а 2 и 4 — к другому. В результате дочерние клетки стали гомозиготными; одна из них содержит доминантные аллели С и D, а другая — рецессивные с и d.



На основе явления митотического кроссинговера можно проводить генетическое картирование. Например, гены А, В, С и D на рис. 15.24 можно считать сцепленными именно в таком порядке, потому что один кроссинговер между центромемой и локусом А приводит к тому, что гомозиготными становятся одновременно все четыре гена, тогда как кроссинговер между А и В переводит в гомозиготное состояние только гены В, С, D и т. д. Как и при мейотическом картировании, относительные расстояния между маркерами определяют на основании относительных частот кроссинговера между ними. Частота митотической рекомбинации может сильно увеличиваться под действием различных индуцирующих агентов; большинство из них обладает также мутагенным действием.

ОБРАЗОВАНИЕ ГЕТЕРОКАРИОНОВ И ПАРАСЕКСУАЛЬНОСТЬ У МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

У мицелиальных грибов слияния происходят не только между гифами гетероталломных особей, относящихся к разным половым типам, но и между двумя штаммами, принадлежащими

к одному и тому же половому типу. Если два штамма относятся к одному половому типу, так что после слияния гифов завершение полового цикла невозможно, в результате образуется один организм, содержащий ядра, полученные от обоих родительских штаммов; такой организм является гетерокарионом. Ядра, происходящие из каждого из родительских мицелиев, мигрируют в цитоплазму друг друга; поскольку мицелии являются многоядерными клетками, миграция, сопровождающаяся делением ядер, приводит впоследствии к полному перемешиванию ядер двух типов.

В большинстве случаев ядра двух типов не сливаются, а делятся путем митозов независимо друг от друга. Фенотипические свойства гетерокариона определяются ядрами обоих типов, так что гетерокарионы обладают свойствами гибридов двух родительских штаммов, хотя все их ядра являются гаплоидными. Ядра двух типов могут разойтись, если образуются одноядерные конидии. Однако многие грибы образуют многоядерные конидии и гетерокарионы могут существовать на протяжении жизненного цикла без полового размножения.

Слияние ядер может происходить не только при образовании плодовых тел, но в редких случаях и в гетерокариотическом мицелии; при этом из гаплоидных ядер двух типов образуется истинное диплоидное ядро. Это явление было впервые обнаружено у аспергиллов благодаря использованию мутантных штаммов, которые образуют конидии с измененной пигментацией. Для получения гетерокариона были использованы мутанты, образующие вместо нормальных зеленых конидий желтые и белые конидии. Поскольку конидии у аспергилл одноядерные, каждая спороносная головка этого гетерокариона обычно образует цепочки желтых и белых спор. Появление диплоидных ядер обнаруживается благодаря появлению цепочки диплоидных спор, которые легко отличить по их зеленой окраске, характерной для организмов дикого типа. Такие споры можно отделить и использовать для выращивания диплоидного мицелия. Гаплоидность никогда не восстанавливается путем мейоза; к ней приводит поочередная утрата одной хромосомы из каждой пары. Гаплоиды, возникающие в результате этого процесса, являются рекомбинантами между двумя родительскими формами, так как каждая их хромосома может происходить от любого из родителей и во время митозов в диплоидном состоянии имеет место рекомбинация между парами хромосом. Это явление называется *парасексуальностью*; оно приводит к таким же генетическим последствиям, как и половой процесс, но не связано с обычными событиями слияния гамет и мейоза. Парасексуальность обуславливает генетическую рекомбинацию у несовершенных грибов, но для грибов, имеющих в своем цикле развития половую стадию, видимо, большого значения не имеет.

РЕКОМБИНАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У ДРОЖЖЕЙ

Митохондрии дрожжей, как и других эукариот, напоминают бактерии по своей чувствительности к некоторым ингибиторам синтеза белка, не оказывающим никакого влияния на рибосомы эукариотической цитоплазмы. К этим ингибиторам относятся хлорамфеникол, эритромицин и спирамицин.

Был выделен ряд мутантов *Saccharomyces cerevisiae*, устойчивых к тому или иному из этих антибиотиков. В каждом случае при скрещивании устойчивого гаплоидного штамма с чувствительным гаплоидным штаммом и мейотической споруляции образовавшегося диплоида признак устойчивости расщеплялся в соотношении 4:0, т. е. наследовался как «цитоплазматический» фактор. Следовательно, изменение рибосомы, ответственное за устойчивость к антибиотику, не только осуществляется в митохондрии, но и определяется митохондриальным геном¹.

Большая серия экспериментов по скрещиванию, проведенных П. Слонимски (P. Slonimski) и его сотрудниками, позволила установить, что митохондриальные гены, происходящие из двух родительских клеток дрожжей, рекомбинируют. Полученные ими данные позволили построить частичную карту сцепления митохондриального генома.

РЕКОМБИНАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОВ У *CHLAMYDOMONAS*

Chlamydomonas reinhardtii—одноклеточная зеленая водоросль, обладающая одним ядром, одним хлоропластом и несколькими митохондриями (рис. 15.25). Это факультативно фотосинтезирующий микроорганизм, который может расти в темноте в присутствии ацетата в качестве источника углерода и энергии. Половой жизненный цикл водоросли регулируется двумя аллелями одного гена, определяющими половой тип; этот ген обозначается *mt*. Половые типы и соответствующие аллельные детерминанты обозначаются *mt*⁺ и *mt*⁻ (рис. 15.26).

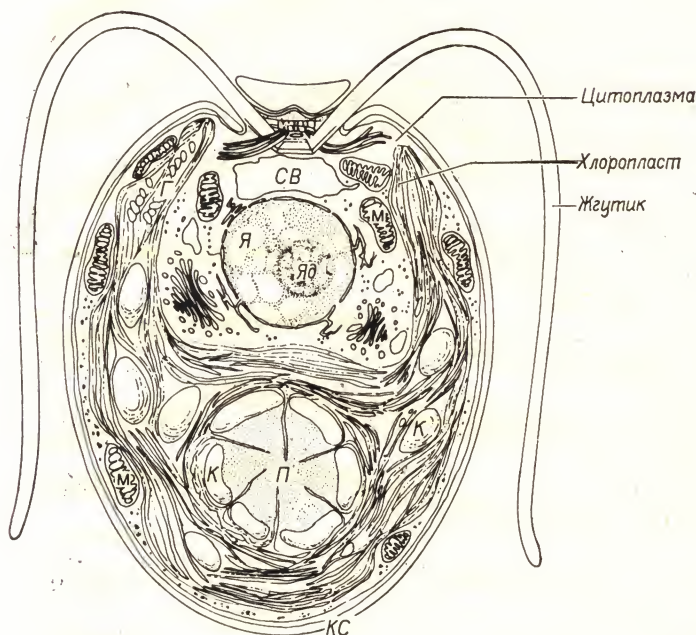
Р. Сэджер и ее коллеги выделили большое число мутантов, которые проявляют цитоплазматическое наследование. К ним относятся мутанты, дефектные по фотосинтезу и требующие ацетат для роста на свету, температурочувствительные мутанты, а также мутанты, устойчивые к ряду антибиотиков, ингибирующих синтез белка в хлоропластах, но не в цитоплазме. При половом скрещивании наследуются мутации только от одного из родителей («материнское» наследова-

¹ Доказательство того, что гены устойчивости к антибиотикам у дрожжей расположены в митохондриях, а не в цитоплазме, вытекает из того факта, что эти гены отсутствуют у некоторых дыхательных мутантов, которые утратили фрагменты митохондриальной ДНК.

Рис. 15.25. Схематическое изображение среза клетки. *КС* — клеточная стенка; *СВ* — сократительная вакуоль; *М* —

митохондрион; *Г* — глазок (стигма); *П* — пиреноид; *К* — зерна крахмала; *Я* — ядро; *Яд* — ядрышко. В клетке име-

ется один хлоропласт. (Sager R., *Cytoplasmic Genes and Organelles*, N.-Y., Academic Press, 1972.)



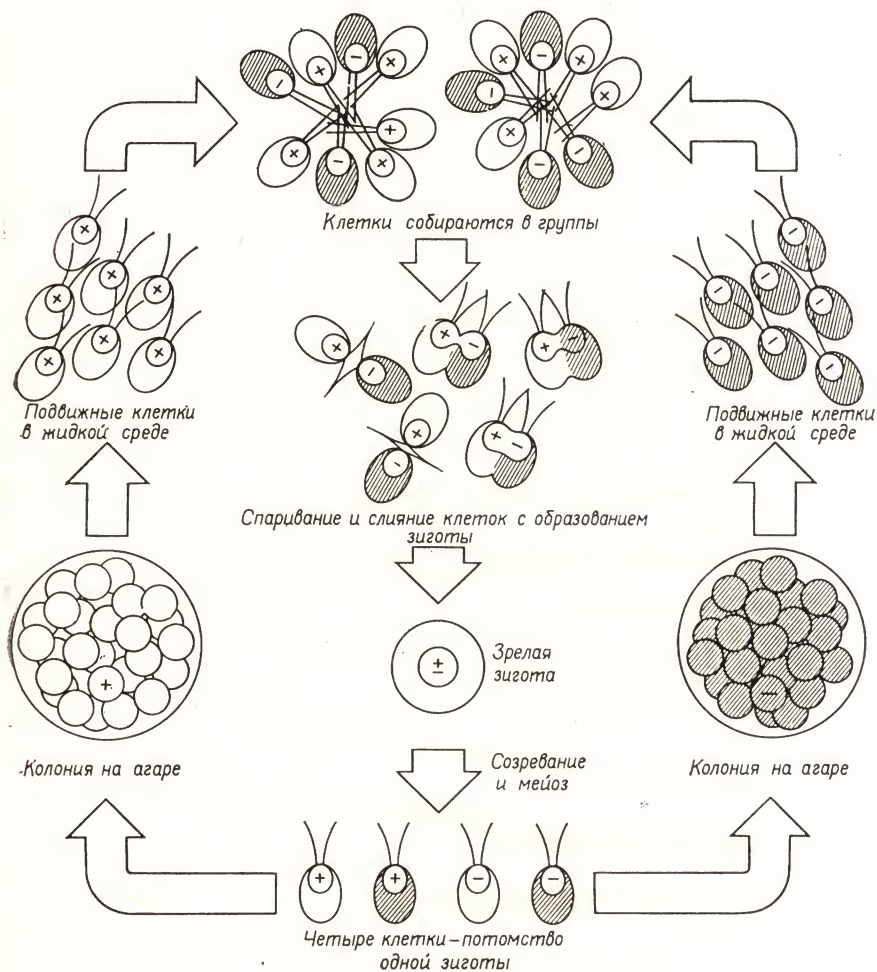
ние); во всех случаях наблюдается расщепление в отношении 4:0, т. е. все четыре гаплоидных потомка наследуют тот аллель, который был у родителя *mt*⁺. Исключения из этого правила (присутствие обоих родительских аллелей у гаплоидного потомства) встречаются менее чем у 1% зигот.

Известен ряд фактов, указывающих на то, что местом локализации генов, наследуемых по материнской линии, является хлоропласт и большинство этих генов отвечает за такие функции хлоропластов, как фотосинтез и синтез белка рибосомами хлоропластов. Наследование от одного из родителей, как было позднее показано Сэджер, отражает полную деградацию в зиготе хлоропластной ДНК, происходящей от родителя *mt*⁻. В очень небольшом числе зигот такой деградации не происходит; мейотические продукты, возникшие из этих редких зигот, содержат гетерозиготную хлоропластную ДНК и сохраняют ее на протяжении последующих митотических делений. При каждом митотическом делении появляются хлоропластные сегреганты, проявляющие фенотип одного из родителей; при многофакторных скрещиваниях появляются

Рис. 15.26. Жизненный цикл *Chlamydomonas reinhardi*. Показана сегрегация половых типов, обозначенных (+) и (—), и несцепленной

пары ядерных генов, обозначенных штриховкой или незаштрихованных. Перед спариванием и слиянием гаплоидные подвижные клетки

собираются в группы. [Sager R., Inheritance in the green alga, *Chlamydomonas reinhardi*, Genetics, 40, 476 (1955).]



рекомбинанты, и это позволяет предположить, что между различными хлоропластными генами имеется сцепление.

Чтобы провести полный генетический анализ процесса расщепления, Сэджер стала искать подходы к повышению частоты появления зигот, наследующих хлоропластные маркеры от обоих родителей. Оказалось, что большинство таких зигот образуется при облучении родительских клеток mt^+ ультрафиолетом. Тогда родительская ДНК mt^- не разрушается и

более 50% зигот ведут себя как хлоропластные гетерозиготы. С помощью этого метода Сэджер удалось получить сегреганты и рекомбинанты в количестве, достаточном для построения подробной генетической карты хлоропластного генома.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Campbell A. M., 1969, *Episomes*, New York, Harper and Row.
Fincham J. R., Day P., 1971, *Fungal Genetics*, 3rd ed., Philadelphia, F. A. Davis.
Meynell G. G., 1973, *Bacterial Plasmids*, Cambridge, Mass., MIT Press. [Имеется перевод: Мейнелл Г. Бактериальные плазмиды. — М.: Мир, 1976.]
Sager R., 1972, *Cytoplasmic Genes and Organelles*, New York, Academic Press, Inc.

Обзоры

- Arber W. (1974), DNA Modification and Restriction, *Progr. Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.*, **14**, 1.
Clark A. J. (1973), Recombination Deficient Mutants of *E. coli* and Other Bacteria, *Ann. Rev. Genetics*, **7**, 67.
Clowes R. C. (1972), Molecular Structure of Bacterial Plasmids, *Bact. Rev.*, **36**, 361.
Curtiss R. (1969), Bacterial Conjugation, *Ann. Rev. Microbiol.*, **23**, 69.
Fogel S., Mortimer R. K. (1971), Recombination in Yeast, *Ann. Rev. Genetics*, **5**, 219.
Gillham N. W. (1974), Genetic Analysis of the Chloroplast and Mitochondrial Genomes, *Ann. Rev. Genetics*, **8**, 347.
Hellinsky D. R. (1973), Plasmid Determined Resistance to Antibiotics: Molecular Properties of R Factors, *Ann. Rev. Microbiol.*, **27**, 437.
Hopwood D. A. (1973), Advances in *Streptomyces coelicolor* Genetics, *Bact. Rev.*, **37**, 371.
Howard-Flanders P. (1973), DNA Repair and Recombination, *British Med. Bull.*, **29**, 226.
Lacey R. W. (1975), Antibiotic Resistance Plasmids of *Staphylococcus aureus* and Their Clinical Importance, *Bact. Rev.*, **39**, 1.
Low K. B. (1972), *Escherichia coli* K-12 F-prime Factors, Old and New, *Bact. Rev.*, **36**, 587.
Notani K., Setlow J. K. (1974), Mechanism of Bacterial Transformation and Transfection, *Progr. Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.*, **14**, 39.
Novick R. P., 1974, Bacterial Plasmids, in C. R. C. Handbook IV (A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, eds.), p. 537, Cleveland, C. R. C. Press.
Pontecorvo G. (1956), The Parasexual Cycle in Fungi, *Ann. Rev. Microbiol.*, **10**, 393.
Radding C. M. (1973), Molecular Mechanisms in Genetic Recombination, *Ann. Rev. Genetics*, **7**, 87.
Sanderson K. E. (1972), Linkage Map of *Salmonella typhimurium*, Edition IV, *Bact. Rev.*, **36**, 558.
Sanderson K. E., Ross H., Ziegler L., Mäkelä P. H. (1972), F⁺, Hfr and F' Strains of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella abony*, *Bact. Rev.*, **36**, 608.
Taylor A. L., Trotter C. D. (1972), Linkage Map of *Escherichia coli* Strain K-12, *Bact. Rev.*, **36**, 504.
Willett N. (1972), The Genetics of Transmissible Plasmids, *Ann. Rev. Genetics*, **6**, 257.

Оригинальные работы

- Davidoff-Abelson R., Dubnau D. (1973), Kinetic Analysis of the Products of Donor DNA in Transformed Cells of *B. subtilis*, J. Bacteriol., **116**, 154.
- Kirby R., Wright L. F., Hopwood D. A. (1975), Plasmid-Determined Antibiotic Synthesis and Resistance in *Streptomyces coelicolor*, Nature, **254**, 265.
- Lacks S., Greenberg B., Neuberger M. (1974), Role of a DNase in the Genetic Transformation of *D. pneumoniae*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **71**, 2305.
- Meselson M. S., Radding C. M. (1975), A General Model for Genetic Recombination, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **72**, 358.
- Morrow J. F., Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., Goodman H., Helling R. B. (1974), Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **71**, 1743.
- Novotny C. P., Fives-Taylor P. (1974), Retraction of *F. pili*, J. Bacteriol., **117**, 1306.
- Reiner A. M. (1974), *E. coli* Females Defective in Conjugation and in Adsorption of a Single-Stranded DNA Phage, J. Bacteriol., **119**, 183.
- Sager R., Ramanis Z. (1973), The Mechanism of Maternal Inheritance in *Chlamydomonas*: Biochemical and Genetic Studies, Theor. and Appl. Genetics, **43**, 101.
- Schupp T., Hutter R., Hopwood D. A. (1975), Genetic Recombination in *Neocardia mediterranei*, J. Bacteriol., **121**, 128.
- Vapnek D., Rupp W. D. (1970), Asymmetric Segregation of the Complementary Sex-factor DNA Strands During Conjugation in *Escherichia coli*, J. Mol. Biol., **53**, 287.

ОГЛАВЛЕНИЕ

8	Регуляция (Перевод А. М. Колчинского)	5
	Биохимическая основа регуляции	7
	Регуляция синтеза ферментов	11
	Сложные системы регуляции	18
	Регуляция синтеза ДНК и деления клетки	30
	Регуляция синтеза РНК	35
	Целесообразность биологических систем	37
	Список литературы	38
9	Рост микроорганизмов (Перевод В. К. Плакунова)	39
	Определение роста	39
	Математическое выражение роста	39
	Измерение роста	44
	Эффективность роста: экономический коэффициент	48
	Синхронный рост	51
	Непрерывные культуры микроорганизмов	55
	Энергия, необходимая для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов	59
	Список литературы	60
10	Влияние окружающих условий на рост микроорганизмов (Перевод В. К. Плакунова)	61
	Функции клеточной мембраны	61
	Поступление питательных веществ в клетку	62
	Влияние растворенных веществ на рост и метаболизм	69
	Влияние температуры на рост микроорганизмов	78
	Отношение к кислороду	83
	Список литературы	87
11	Взаимоотношение между структурой и функцией в клетках прокариот (Перевод В. К. Плакунова)	88
	Поверхностные структуры прокариотической клетки	88
	Молекулярная структура жгутиков и пилей	120
	Хемотаксис подвижных бактерий	126
	Особые органеллы прокариот	131
	Внутриклеточные запасные вещества прокариот	137
	Ядро	144
	Список литературы	151
12	Вирусы (Перевод Ю. Н. Зографа и В. Г. Никифорова)	153
	Открытие фильтрующихся вирусов	153
	Основные свойства вирусов	154
	Вирусы бактерий	165
	Выявление фаговых частиц и определение их количества	165
333	ДНК-содержащие бактериофаги: литический цикл инфекции	168
	Лизогения	176

	РНК-содержащие бактериофаги	185
	Вирусы животных	187
	Размножение вирусов животных	191
	Онкогенные вирусы	195
	Список литературы	205
13	Мутации и действие гена на молекулярном уровне (Перевод А. М. Колчинского)	206
	Химические механизмы мутаций	207
	Действие мутаций на процесс трансляции	222
	Генетические аспекты регуляции	225
	Генетическая комплементация	233
	Мутации у бактериофагов	238
	Список литературы	240
14	Фенотипическое выражение мутантных генов у вирусов, в клетках и клеточных популяциях (Перевод А. М. Колчинского)	242
	Влияние мутаций на фенотип	242
	Отбор и выявление мутантов	247
	Условное выражение мутантного гена	250
	Время фенотипического выражения мутантного гена	253
	Динамика популяции	256
	Отбор и адаптация	265
	Последствия мутаций в клеточных органеллах	267
	Мутантные бактериофаги	267
	Список литературы	269
15	Генетическая рекомбинация (Перевод А. М. Колчинского)	270
	Рекомбинация у бактерий	270
	Трансформация бактерий	277
	Конъюгация бактерий	281
	Свойства плазмид	286
	Процесс конъюгации	292
	Перенос бактериальной хромосомы с участием F-фактора	295
	Основные группы плазмид	305
	Конъюгация в различных группах бактерий	314
	Трансдукция с участием бактериофага	316
	Рекомбинация бактериальных вирусов	321
	Рекомбинация у эукариотических микроорганизмов	322
	Список литературы	331

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Р. Стейннер, Э. Эдельберг,

Дж. Ингрэм

МИР МИКРОБОВ

том 2

Научн. редакторы Н. М. Амелянчик и Н. Н. Шафрановская

Младший редактор О. И. Горгун

Художник Л. Н. Кулагин

Художественный редактор Б. Н. Юдкин

Технический редактор Л. П. Чуркина

Корректор В. И. Постнова

ИБ № 1855

Сдано в набор 23.01.79.

Подписано к печати 16.05.79.

Формат 60 × 90¹/₁₆

Бумага кн. журн.

Гарнитура латинская. Печать высокая.

Объем 10,50 бум. л. Усл. печ. л. 21. Уч.-изд. л. 21,75.

Изд. № 4/9870. Тираж 12 000 экз. Зак. 1261. Цена 1 р. 80 к.

Издательство «Мир»

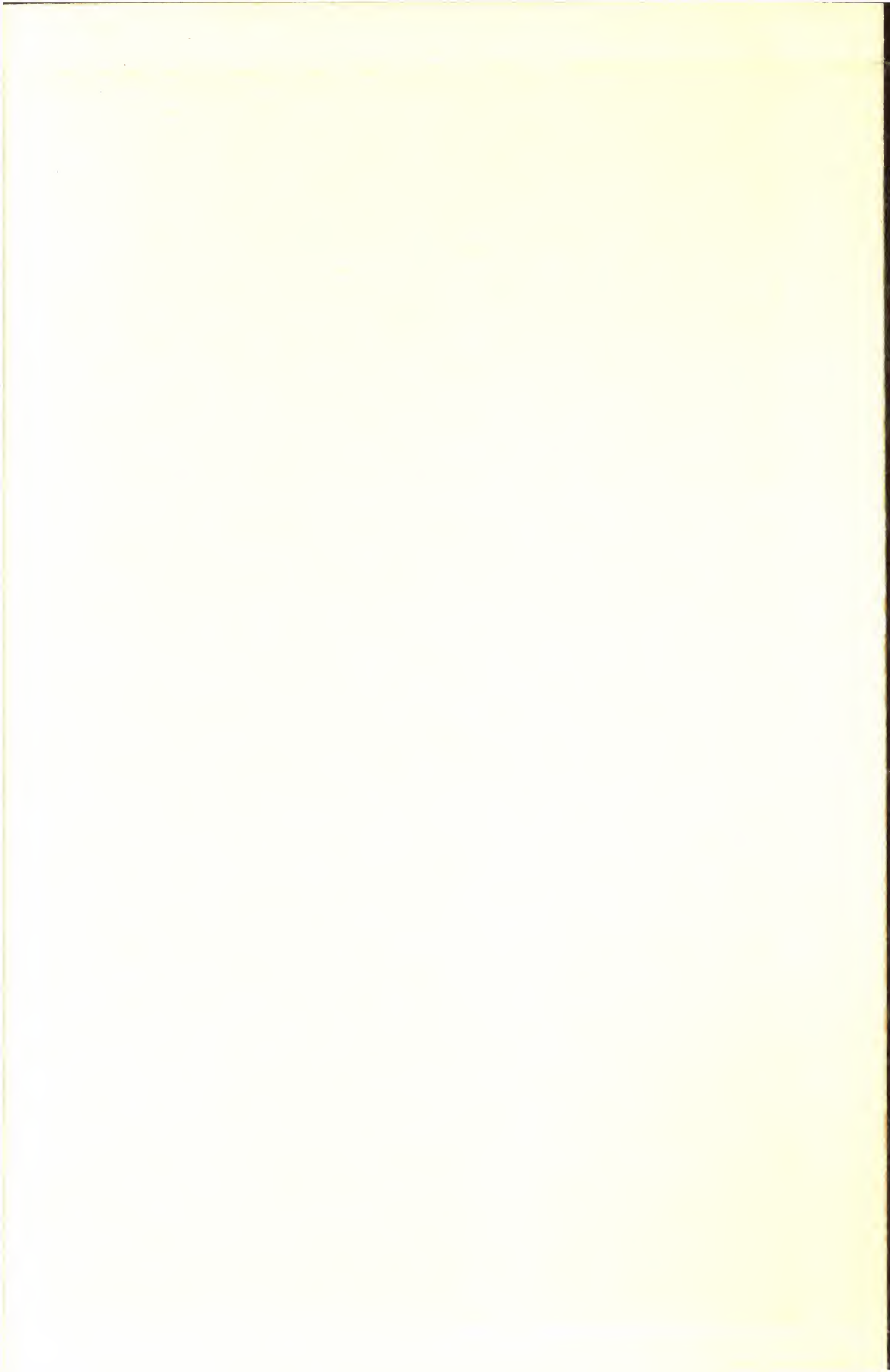
Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома

при Государственном комитете Совета Министров СССР по
делам издательств, полиграфии и книжной торговли

113105. Москва, Нагатинская ул., 1.







WILLIAM

MAKIN

BOOKS

21